

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie,
Universitätsmedizin Rostock
Direktorin: Frau Professor Dr. med. G.F.E. Nöldge-Schomburg

**Das Fibrin-Spaltprodukt B β ₁₅₋₄₂ verbessert das Überleben und die
funktionell-neurologische Regeneration nach kardiopulmonaler Reanimation**
- Untersuchungen an einem murinen Reanimationsmodell -

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von:

Claudia Beltschany, geb. am 13.05.1977 in Pößneck
aus Rostock

Rostock, den 18.01.2013

Gutachter:

PD Dr. med. Jan-Patrick Roesner: Universität Rostock, Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Rostock

Prof. Dr. med. Hüseyin Ince: Viviantes Klinikum Am Urban, Berlin

Prof. Dr. Dr. med. Kai Zacharowski, Universitätsklinikum der Goethe Universität, Frankfurt

Datum der Einreichung: 18.01.2013

Datum der Verteidigung: 24.06.2013

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
2. Material und Methoden	9
2.1. Versuchstiere	9
2.2. Versuchsablauf der Reanimation	10
2.2.1. Vorbereitung zur Reanimation	10
2.2.1.1. Narkoseeinleitung, Beatmung, Temperaturkontrolle	10
2.2.1.2. Hämodynamisches Monitoring, i.v.-Zugang	11
2.2.2. Reanimation	12
2.2.3. Randomisierung und Medikamentengabe	14
2.2.4. Entwöhnung von der Beatmung	14
2.3. Neurophysiologische Testverfahren	16
2.3.1. Körpergewicht	17
2.3.2. NeuroScore	18
2.3.3. RotaRod-Test	19
2.3.4. Elevated Plus Maze-Test	20
2.3.5. Water-Maze-Test	21
2.4. Histologische Aufarbeitungen	23
2.5. Statistische Auswertungen	24
3. Ergebnisse	25
3.1. Ergebnisse der Langzeituntersuchung	25
3.1.1. Überleben	26
3.1.2. Körpergewicht/neurophysiologische Testverfahren	29
3.1.2.1. Körpergewicht	29
3.1.2.2. NeuroScore	31
3.1.2.3. RotaRod-Test	31
3.1.2.4. Elevated Plus Maze-Test	32
3.1.2.5. Water-Maze-Test	35
3.2. Ergebnisse der Kurzzeituntersuchung	36
3.2.1. Immunhistologische Untersuchungen/Histologie der Lunge	36
3.3. Nebenfunde	39

4. Diskussion	41
4.1. Modellkritik	42
4.2. Überleben	45
4.3. Körpergewicht	46
4.4. Neurophysiologische Testverfahren	46
4.5. Histologie/Immunhistochemie	47
4.6. Kritik der neurophysiologischen Testverfahren	48
5. Schlussfolgerung	50
6. Selbstständigkeitserklärung	51
7. Thesen	52
8. Tabellarischer Lebenslauf	53
9. Literatur	55

Abkürzungsverzeichnis

AED	Automatisierter Externer Defibrillator
CA	Cardiac Arrest
CAE-Färbung	Chlorazetat-Esterase Färbung
CPR	Cardiopulmonary Resuscitation
DAPI-Färbung	4',6-Diamidino-2-phyllindole-Färbung
f	Frequenz
FPA	Fibrinpeptid A
FPB	Fibrinpeptid B
FiO ₂	inspiratorische Sauerstoffkonzentration
FITS	Fluoresceinisothiocyanat
GCS	Glasgow Coma Scale
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HF	Herzfrequenz
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IRIS	Ischämie, Reperfusion, Inflammation, & Sepsis
KG	Körpergewicht
MAP	mittlerer arterieller Druck (mean arterial pressure)
MODS	Multiorgandysfunktionssyndrom
NIBP	nicht-invasiver Blutdruck
PBS	Phosphat Buffered Solution
ROSC	Return of Spontaneous Circulation
SIRS	systemisches inflammatorisches Response Syndrom
VE-Cadherin	vascular-endothelial cadherin
ZVK	zentraler Venenkatheter

1. Einleitung

Trotz vieler Jahre klinischer und experimenteller Forschung sind das Überleben und das funktionell-neurologische Behandlungsergebnis nach Herz-Kreislaufstillstand und kardiopulmonaler Reanimation weiterhin schlecht.

In Europa kommt es jährlich zu ca. 275.000 reanimationspflichtigen Herz-Kreislaufstillständen. Nur 10,7 % dieser Patienten überleben bis zur Entlassung aus dem Krankenhaus [1]. Von allen Patienten, bei denen ein spontaner Kreislauf wieder erreicht wird, sind ca. 80 % bei Krankenhausaufnahme komatös. 70 % dieser Patienten werden aufgrund von neurologischen Defiziten nicht mehr in der Lage sein, ein eigenständiges Leben führen zu können [2].

Nach einer erfolgreichen Reanimation entwickeln viele Patienten ein Multiorgandysfunktionssyndrom (MODS), das als "post-cardiac arrest syndrome" bezeichnet wird [3]. Dies ist gekennzeichnet durch neuronale und myokardiale Dysfunktionen, sowie einem systemischen Inflammationssyndrom (SIRS). Im Gehirn kommt es zum Untergang von Neuronen. Auf Zellebene unterscheidet man zwei Phasen, die akute Nekrose und die nach einigen Tagen folgende Apoptose in selektiv vulnerablen Regionen, wie Hippocampus, Nucleus reticularis thalami und Kortex. Im Bereich des kardio-vaskulären Systems kommt es zu ventrikulärer Dysfunktion mit systolischen und diastolischen Funktionseinschränkungen [4].

Nach einem Ereignis einer globalen Ischämie und Reperfusion [5], wie beispielsweise nach einer Reanimation, werden inflammatorische Kaskaden aktiviert, die u. a. in einer Leukozytenaktivierung, erhöhten Leukozyten-Endothelinteraktion [6] und einer endothelialen Schädigung [7] enden. Daraus resultieren Störungen sowohl der Makro- als auch der Mikrozirkulation. Außerdem kommt es zur Aktivierung des Gerinnungssystems.

Des Weiteren bestehen bei vielen Patienten eine oder mehrere Grunderkrankungen, wie z.B. akutes Koronarsyndrom, Lungenerkrankungen, Blutung, Sepsis u. ä., die ursächlich für den Herz-Kreislaufstillstand gewesen sein könnten und selbst therapiepflichtig sind.

Während nach Überleben eines innerklinischen Herz-Kreislaufstillstandes das Multiorganversagen überwiegt, ist nach präklinischem Herz-Kreislaufstillstand die Einschränkung der Gehirnfunktion durch hypoxische Enzephalopathie für das Schicksal der Patienten ausschlaggebend [4]. Einer der limitierenden Faktoren für

eine effektive und erfolgreiche Rehabilitation der Patienten nach überlebtem Herz-Kreislaufstillstand ist die eingeschränkte neurologische Funktion. Ein Umstand der nicht nur individuelle, sondern auch sozio-ökonomische Folgen hat. In den letzten Jahrzehnten haben nur wenige Therapien eine Reduktion des postischämischen neurologischen Schadens und eine Verbesserung der Überlebensrate nachweisen können und Einzug in die Klinik gehalten. Dazu zählen die kontrollierte milde therapeutische Hypothermie, die rasche perkutane Koronarintervention, die frühestmögliche hämodynamische Stabilisierung und die symptomatische Behandlung der zugrundeliegenden bzw. begleitenden Erkrankungen [8].

Das Fibrin-Spaltprodukt B β ₁₅₋₄₂ ist ein körpereigenes Peptid. Es besteht aus 28 Aminosäuren der β -Kette des Fibrins und entsteht physiologisch im Rahmen der Fibrinolyse.

Fibrinogen ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 340.000 Dalton und wird in der Leber synthetisiert. Es besteht aus drei paarweise angeordneten Polypeptidketten ($A\alpha$, $B\beta$, γ), die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die einzelnen Ketten bestehen aus 610, 461 und 411 Aminosäuren. Das Fibrinogenmolekül besitzt eine ausgeprägte Domänen-Struktur aus drei globulären Anteilen, der zentralen E-Domäne und den beiden äußeren D-Domänen, die jeweils durch stabartige Bereiche (sog. Coiled-coil-Strukturen) miteinander verbunden sind. Die E-Domäne wird von den aminoterminalen Bereichen aller sechs Polypeptidketten gebildet, während die D-Domäne vor allem aus den C-Termini der $B\beta$ - und der γ -Kette gebildet wird. Thrombin katalysiert sowohl die Abspaltung des Fibrinpeptid A (FPA), die aus den 16 aminoterminalen Aminosäuren der $A\alpha$ -Kette besteht, als auch (etwas verzögert) die Abspaltung des Fibrinpeptid B (FPB).

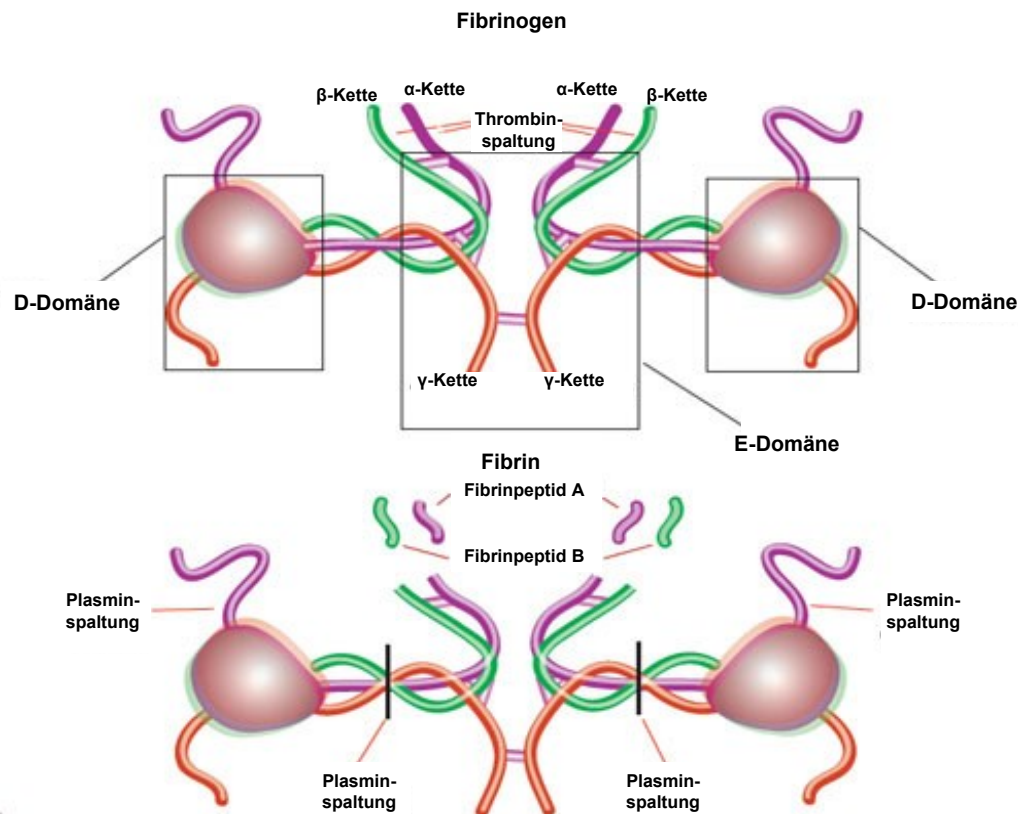


Abb.1: schematische Darstellung der Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin (modifiziert nach Putman F.W. The Plasma Proteins, 2nd edition, P.148)

Seit den 70er Jahren gibt es Hinweise darauf, dass Fibrinogen bzw. Fibrin nicht nur an der Blutgerinnung beteiligt ist, sondern auch eng in die pathophysiologischen Kaskaden der Inflamationsreaktionen eingebunden ist. So wurden beim Menschen Fibrinablagerungen an der Gefäßwand mit entzündlichen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht [9]. Des Weiteren konnte in Tiermodellen gezeigt werden, dass bei Abwesenheit von Fibrinogen experimentell ausgelöste Entzündungskrankheiten in deutlich geringerem Ausmaß ablaufen [10,11].

Fibrin wird bei Entzündungsreaktionen gebildet, entlang von Gefäßwänden abgelagert sowie gleichzeitig durch Plasmin abgebaut. Dabei entstehen sog. D- und E-Fragmente. Lediglich die E-Fragmente besitzen sowohl Bindungsstellen für VE-Cadherin (vascular endothelial cadherin), als auch für CD11c, ein Oberflächenmarker von Leukozyten. VE-Cadherin ist ein endothelzellspezifisches Adhäsionsmolekül, das für die Barrierefunktion der Endothelzellschicht von großer Bedeutung ist und von den Leukozyten bei der Transmigration überwunden werden muss. [12]. Damit haben Fibrinfragmente eine pro-inflammatorische Wirkung, indem sie über eine initiale Anhaftung am Endothel schließlich die Transmigration von

Leukozyten aus dem Blutstrom in das umliegende Gewebe fördern [13]. Als Bindungsstelle für das VE-Cadherin auf den Endothelzellen wurde ein kurzer Peptidabschnitt auf den E-Fragmenten identifiziert ($B\beta_{15-42}$ mit der Aminosäuresequenz GHRPLDKKREEAPSLRPAPPPISGGGYR) [15].

Das Fibrin-Spaltprodukt $B\beta_{15-42}$ entsteht im menschlichen Organismus während der Fibrinspaltung aus E-Fragmenten in niedriger Konzentration (0,41 pmol/ml) [14]. Es bindet sich nur an VE-Cadherin, jedoch nicht an Leukozyten. Wird es in supraphysiologischer Dosis verabreicht, werden die Bindungsstellen an VE-Cadherin besetzt, so dass weniger Leukozyten-Endothel-Interaktionen auftreten und damit die Leukozytentransmigration in geschädigtes Gewebe reduziert wird.

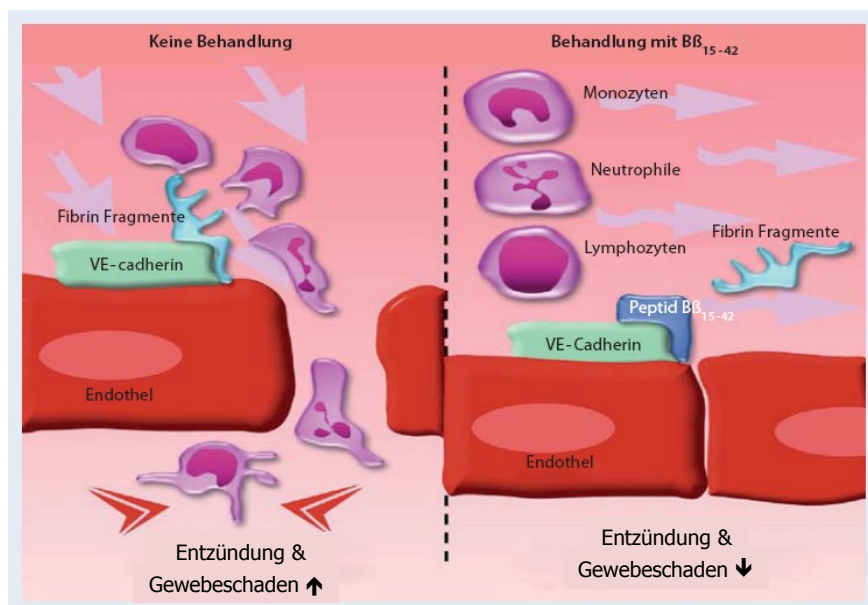


Abb 2: Anti-inflammatorischer Wirkmechanismus von $B\beta_{15-42}$ nach supraphysiologischer Dosis (modifiziert nach Zacharowski).

Auf der linken Seite der Abbildung binden die bei Reperfusion entstandenen pro-inflammatorischen Fibrinspaltprodukte (E-Fragmente) an VE-Cadherin und unterstützen die Leukozytentransmigration in das geschädigte Gewebe. Dadurch werden die Entzündung und der Gewebeschaden verstärkt. Wird $B\beta_{15-42}$ appliziert (rechte Seite der Abbildung), werden die Bindungsstellen an VE-Cadherin besetzt. Dadurch ist die Bindung von Leukozyten an VE-Cadherin vermindert und die Leukozytentransmigration in das geschädigte Gewebe reduziert. In der Folge verringert sich die Entzündung im betroffenen Gewebe und somit der Gewebeschaden.

Im Tierversuch zeigte das Fibrin-Spaltprodukt $B\beta_{15-42}$ eine Reduktion des Reperfusionsschadens nach Myokardinfarkt [15,16], hämorrhagischen Schock [17,18] und Pneumonie [19].

$B\beta_{15-42}$ wurde bereits in einer Phase I-Studie untersucht [15] und in einer Interventionsstudie als Substanz FX06 eingesetzt [20,21].

Fragestellung

In der Arbeitsgruppe IRIS (Ischämie, Reperfusion, Inflammation & Sepsis) ist ein valides und hochstandardisiertes Kleintierreanimationsmodell etabliert [22]. Mit Hilfe dieses Modells können Mechanismen in den pathophysiologischen Prozessen des globalen Ischämie-/Reperfusionsschadens sowie therapeutische Strategien untersucht werden. Mit Hilfe eines 28-tägigen Untersuchungszeitraumes können auch späte Veränderungen, wie sie im Verlauf des „postcardiac arrest syndroms“ auftreten, untersucht werden. Ein weiterer Schwerpunkt des Modells liegt auf der funktionell-neurologischen Regeneration nach Herz-Kreislaufstillstand und nachfolgender Reanimation, die durch Verwendung mehrerer neurophysiologischer Tests untersucht bzw. quantifiziert werden.

Diese Arbeit untersucht die Fragestellung welchen Einfluss das Fibrin-Spaltprodukt $B\beta_{15-42}$ auf das Überleben und die funktionell-neurologische Regeneration von Mäusen nach einem 4-minütigen Herz-Kreislaufstillstand und nachfolgender kardiopulmonaler Reanimation hat.

Die Hypothese lautet: Das Fibrin-Spaltprodukt $B\beta_{15-42}$ verbessert nach einem 4-minütigen Herz-Kreislaufstillstand und anschließender kardiopulmonaler Reanimation das Überleben und die funktionell-neurologische Regeneration von Mäusen in einem Zeitraum von 28 Tagen nach Reanimation.

2. Material und Methoden

Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine prospektiv-randomisierte, tierexperimentelle Studie. Die Tierversuche wurden nach entsprechendem Antrag durch das zuständige Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei, Mecklenburg-Vorpommern genehmigt (LALLF MV/TSD/7221.3-1.1-060/06).

2.1. Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden männliche C57BL/6J-Mäuse (n = 86) der Firma Charles River, Deutschland verwendet. Die Mäuse waren zwischen 12 - 16 Wochen alt und hatten ein Körpergewicht von 24 - 29 g. Die Tiere erhielten die Gelegenheit, sich innerhalb von 7 Tagen an die Laborbedingungen anzupassen. Dazu wurden sie in standardisierten Käfigen im Institut für Experimentelle Chirurgie, Universität Rostock untergebracht. Sie unterlagen einer konstanten Raumtemperatur von 22° C und einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Standardfutter für Nagetiere.

Zur Beantwortung der Fragestellung erfolgte die Einteilung des Experiments in zwei Abschnitte.

Der erste Abschnitt (Langzeitstudie) diente zur Beurteilung des Überlebens und der funktionell-neurologischen Regeneration der Versuchstiere nach Herz-Kreislaufstillstand und kardiopulmonaler Reanimation. Für den Überlebensversuch und die neurologische Nachbeobachtung wurden 60 Tiere (jeweils 30 pro Versuchsgruppe) verwendet. Die Tiere wurden für 28 Tage nachbeobachtet.

Im zweiten Abschnitt wurde der Einfluss des Herz-Kreislaufstillstandes auf die Inflamationsreaktion in der Lunge untersucht. Für die Kurzzeitversuche erfolgte bei 10 Tieren (je 5 pro Versuchsgruppe) 1,5 Stunden nach Reanimation die Injektion von FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-Lectin. Anschließend wurden die Tiere getötet und das Lungengewebe kryokonserviert. In einem zweiten Kurzzeitversuch wurden 16 Tiere (je 8 pro Versuchsgruppe) 8 Stunden nach Reanimation getötet und Gewebe zur histologischen Aufarbeitung entnommen.

2.2. Versuchsablauf der Reanimation

2.2.1. Vorbereitung der Reanimation

2.2.1.1. Narkoseeinleitung, Beatmung, Temperaturkontrolle

Nach Abschluss der vorbereitenden Untersuchungen (Gewicht, RotaRod, Elevated Plus Maze-Test und NeuroScore) und einer Ruhezeit von einer Stunde erfolgte die Narkoseeinleitung durch die intraperitoneale Injektion von Ketamin (12 µg/g) und Xylazine (8 µg/g). Die Tiere wurden auf den Rücken gelagert, orotracheal intubiert (Tubus: 22G) und maschinell beatmet (MiniVent; Hugo Sachs, March-Hugstetten, Deutschland). Die inspiratorische Sauerstoffkonzentration (FiO₂) lag bei 0,4. Die Beatmung der Tiere erfolgte mit einem Tidalvolumen von 10 µl/g und einer Atemfrequenz von 130/min. Zur Überprüfung der körperlsgewichtsbezogenen Beatmungseinstellungen wurden in Vorarbeiten 8 Versuchstiere nur narkotisiert, intubiert und maschinell beatmet. Anschließend erfolgte die Bestimmung einer arteriellen Blutgasanalyse. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Ausgangswerte vor Reanimation			
pH	7,36	[7,32 - 7,42]	
paO ₂	258,8	[202,2 - 270,9]	mm Hg
paCO ₂	40,6	[36,3 - 47,3]	mm Hg
HCO ₃ ⁻	22,8	[22,0 - 23,8]	mmol/l
BE	-2,5	[-5,5 - 2,0]	mmpl/l
Hb	9,1	[8,7 - 9,5]	mmol/l
Hk	43	[41 - 45]	%
Na ⁺	149	[146 - 150]	mmpl/l
K ⁺	4,4	[3,5 - 4,6]	mmol/l
Ca ²⁺	1,15	[1,12 - 1,16]	mmol/l

Tabelle1: Ergebnisse der arteriellen Blutgasanalyse einer Kontrollgruppe (n = 8) zur Überprüfung der körperlsgewichtsbezogenen Beatmungseinstellungen; Median (25 - 75 Perzentile)

Zur Überwachung und Konstanthaltung der Körpertemperatur auf 36° C wurde eine rektale Temperatursonde platziert und die Tiere auf einer rückgekoppelten Wärmeplatte gelagert (Effenberger, Pfaffing, Deutschland). Um Wärmeverluste durch Konvektion, Strahlung und Verdunstung, insbesondere während der Narkose und des Herz-Kreislaufstillstandes zu vermeiden, wurden die Mäuse zusätzlich mit Mullkompressen und Alufolie abgedeckt.

2.2.1.2. Hämodynamisches Monitoring, i.v.-Zugang

Das hämodynamische Monitoring erfolgte über EKG mittels Nadelelektroden. Um die Schwanzwurzel wurde eine Blutdruckmanschette platziert, um nicht-invasiv den Blutdruck zu messen und das Pulsdrucksignal der Schwanzarterie abzuleiten (AD Instruments; Spechbach, Deutschland). Die Daten des hämodynamischen Monitorings wurden mit einem PC aufgezeichnet (AD Instruments; Sprechbach, Deutschland). Um einen sicheren Venenzugang zu installieren, wurde die ventrale Halsseite unter einem Operationsmikroskop präpariert und die rechte Vena jugularis externa dargestellt und freipräpariert. Anschließend erfolgte die Einbringung und Fixierung eines Polyethylenkatheter (PE 50, ID 0,28 mm; Portex, Hythe, Großbritannien).

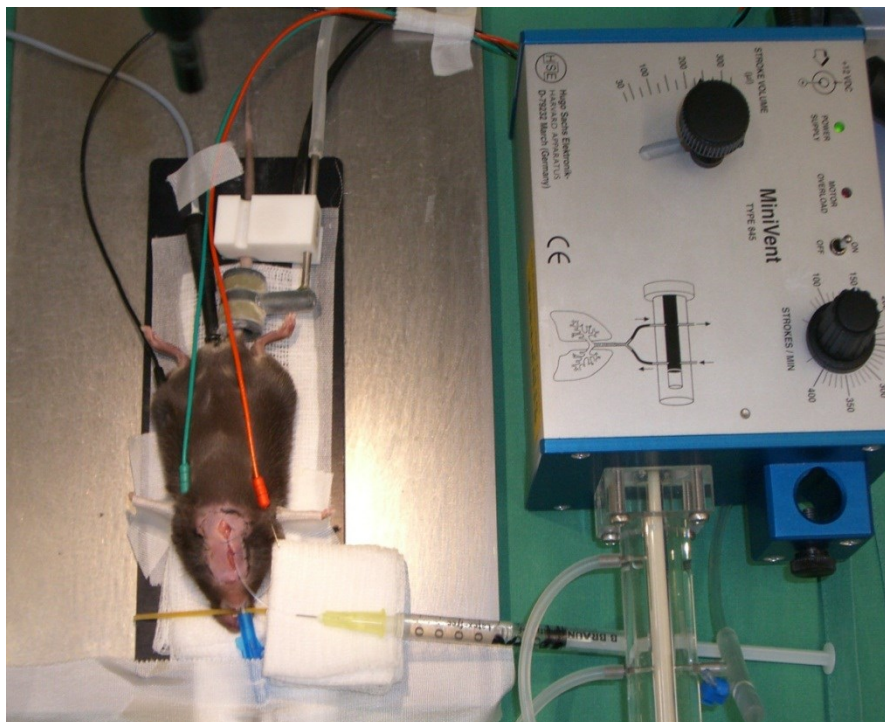


Abb.3: hämodynamisches Monitoring und Beatmung

2.2.2. Reanimation

Die Induktion des Herz-Kreislaufstillstandes erfolgte durch Injektion von Kaliumchlorid (80 µg/kg) über den zentralen Venenzugang und wurde mittels Asystolie im EKG und dem Verlust der arteriellen Druckkurve über der Schwanzarterie verifiziert. Die maschinelle Beatmung wurde zu diesem Zeitpunkt unterbrochen. Nach exakt 4 Minuten Asystolie erfolgte die mechanische Reanimation des Versuchstieres. Adrenalin wurde intravenös (400 µg/kg) über den zentralen Venenkatheter injiziert und die maschinelle Beatmung wieder aufgenommen (FiO₂: 1,0, VT: 12 µl/g; AF: 200/min). Zur Thoraxkompression verwendeten wir eine handelsübliche, für diesen Zweck umgebaute Nähmaschine mit einem in der Höhe verstellbaren Tisch. Dadurch konnte eine standardisierte mechanische Reanimation mit einer Kompressionsfrequenz von 450/min und einer Kompressionstiefe von 7 - 8 mm gewährleistet werden [22].

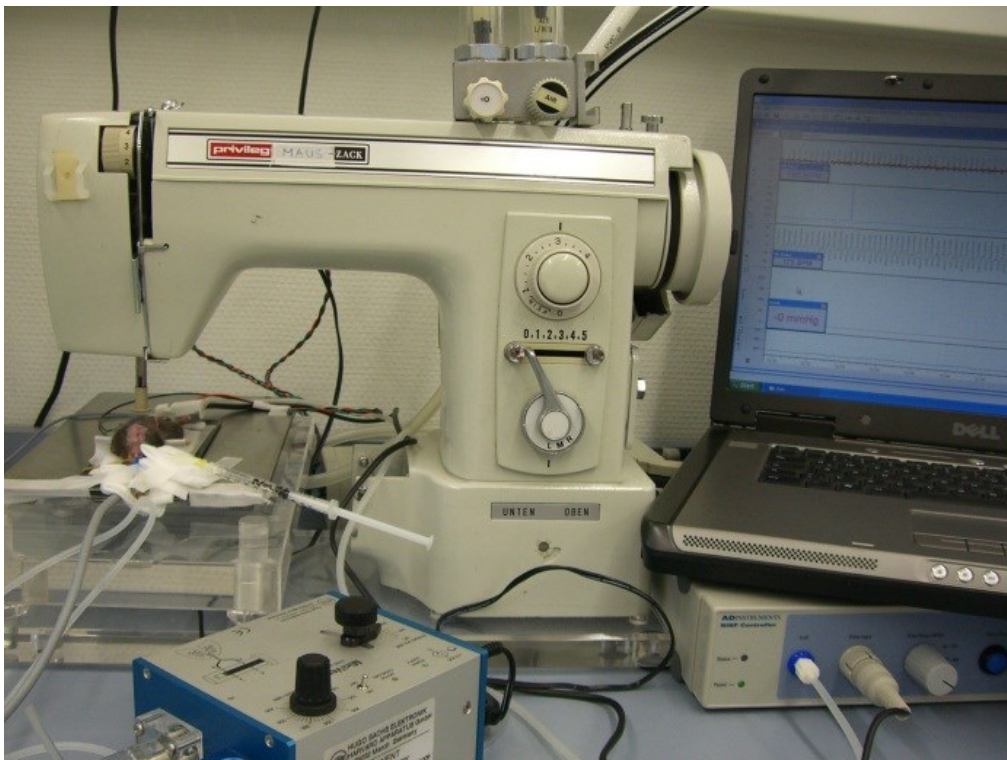


Abb. 4: Reanimationsarbeitsplatz

Eine erfolgreiche Reanimation stellte sich als Wiedereinsetzen einer regelrechten Herzaktion im EKG, einer Wiederkehr der Druckkurve über der Schwanzarterie und einer sichtbaren Kontraktion des Herzens am ventralen Thorax dar (ROSC). Falls nach einer Minute mechanischer Reanimation kein Spontankreislauf erreicht werden

konnte, erhielt das Tier eine zweite Dosis Adrenalin (200 µg/kg). Eine Reanimation galt als erfolglos, wenn sich nach 3 Minuten mechanischer Reanimation und maximal 3 Dosen Adrenalin kein Spontankreislauf einstellte. 2 Minuten nach Erreichen eines Spontankreislaufes wurde die inspiratorische Sauerstoffkonzentration auf 0,6 reduziert und nach weiteren 18 Minuten bis zur Extubation auf 0,4 eingestellt.

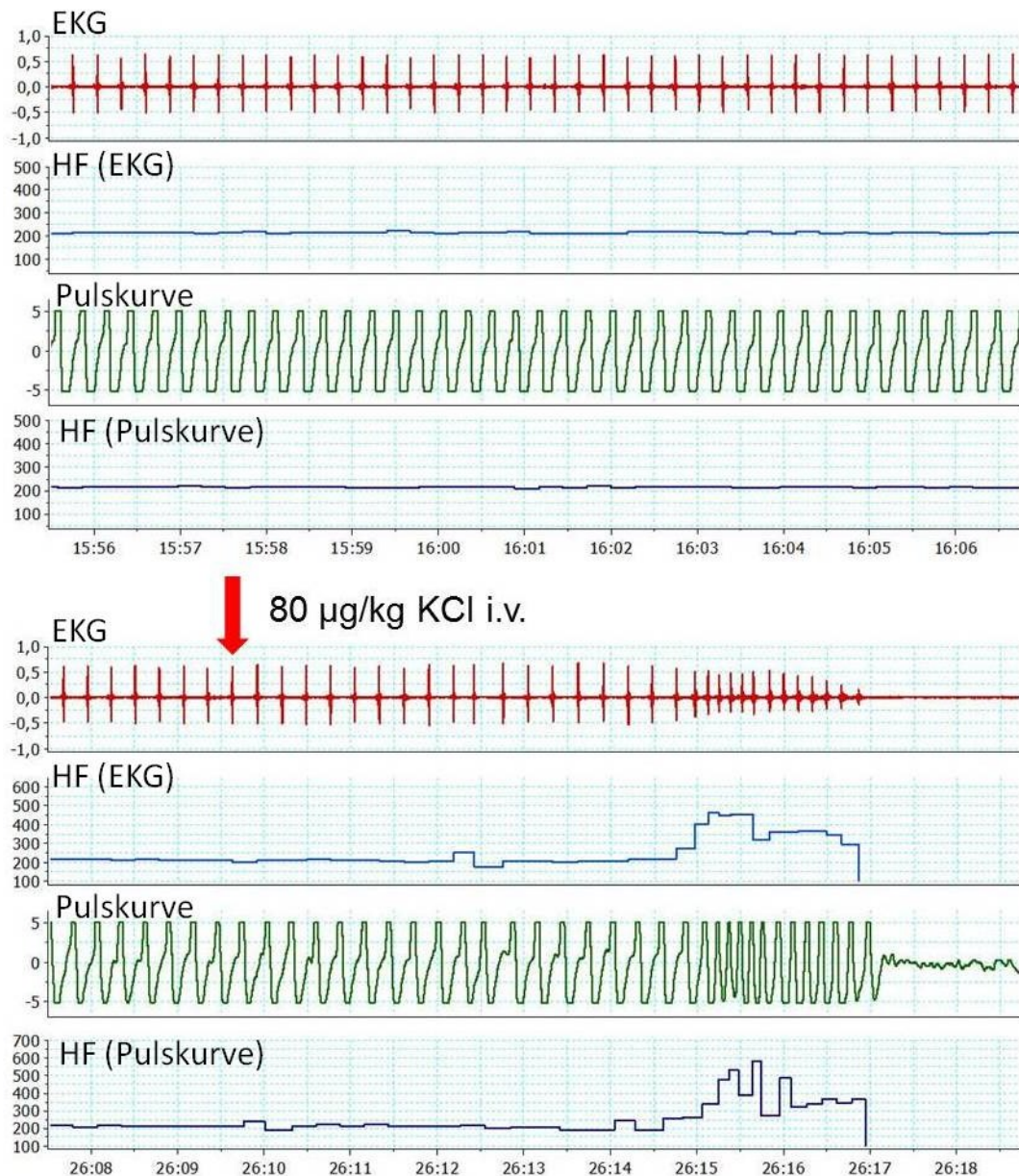


Abb.5: oberer Teil der Abbildung: Bedingungen vor Induktion des Herz-Kreislaufstillstandes; unterer Teil der Abbildung: Induktion des Herz-Kreislaufstillstandes mit Asystolie im EKG und Verlust der Druckkurve über der Schwanzarterie

2.2.3. Randomisierung und Medikamentengabe

Die randomisierte Zuteilung der Versuchstiere zur Therapiegruppe (CA/CPR - B β ₁₅₋₄₂) bzw. Kontrollgruppe (CA/CPR - NaCl 0,9 %) erfolgte per Losverfahren nach Abschluss der Präparation. Die Therapiegruppe erhielt 2,4 mg/kg KG des Fibrin-Spaltproduktes B β ₁₅₋₄₂, aufgelöst in 0,15 ml NaCl 0,9 %-Lösung intravenös über den zentralen Venenkatheter zu Beginn der Reanimation (Zeitpunkt: 0 min.). Die Kontrollgruppe erhielt die gleiche Menge (0,15 ml) NaCl 0,9 % intravenös ebenfalls zu Beginn der Reanimation. 51 Minuten nach erfolgreicher Reanimation erfolgte in der Therapiegruppe die zweite identische Gabe des Fibrin-Spaltproduktes B β ₁₅₋₄₂ (2,4 mg/kg KG in 0,15 ml NaCl 0,9 %). Die Kontrollgruppe erhielt ebenfalls eine zweite Gabe NaCl 0,9 % (0,15 ml).

2.2.4. Entwöhnung von der Beatmung

75 Minuten nach erfolgreicher Reanimation wurde der zentrale Venenkatheter entfernt und die Vena jugularis externa ligiert. Es erfolgte der Wundverschluss nach Desinfektion mit einreihiger Naht (Prolene 6.0 Firma: Ethicon Johnson&Johnson, Belgien). Nach Einsetzen suffizienter Spontanbewegungen des Versuchstieres sowie einer ausreichenden Spontanatmung wurden die Mäuse von der maschinellen Beatmung entwöhnt und extubiert. Zur Nachbeobachtung wurden sie alleine in einen Käfig verbracht. Aufgrund der deutlichen körperlichen Beeinträchtigung in den ersten Stunden nach Reanimation mit erschwelter Erreichbarkeit der Trinkbehälter erfolgte zur Vermeidung einer Dehydratation die Gabe eines Flüssigkeitsbolus von 1,0 ml Vollelektrolytlösung (Sterofundin® Firma: Braun Melsungen AG, Deutschland) subkutan. Zur postoperativen Schmerztherapie wurde dem Trinkwasser Metamizol (500 mg/200 ml) zugesetzt.

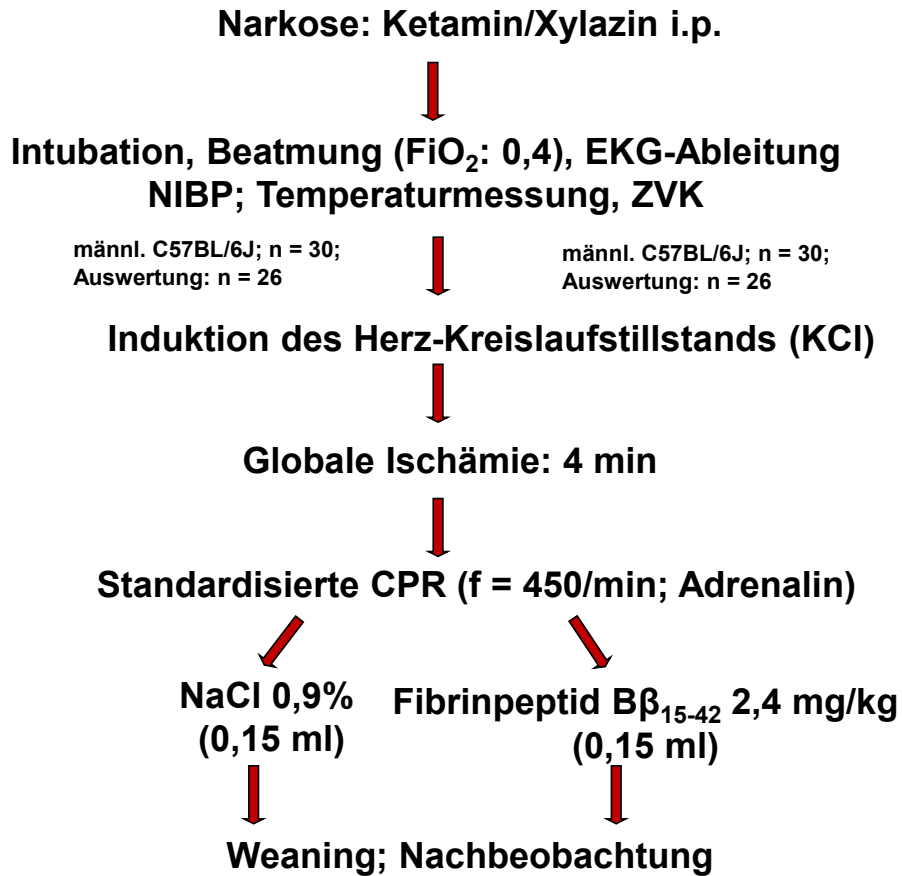


Abb.6: schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur kardiopulmonalen Reanimation

2.3. Neurophysiologische Testverfahren

Das Hauptaugenmerk dieser Untersuchung lag auf dem Überleben und der funktionell-neurologischen Regeneration der Versuchstiere. Regenerationsprozesse benötigen Zeit. Daher ist die Überlebensstudie als Langzeitstudie mit einem Beobachtungszeitraum von 28 Tagen konzeptioniert worden. Um eine Aussage über die funktionell-neurologische Regeneration treffen zu können, wurde neben dem Überleben auch der Verlauf des relativen Körpergewichtes, der NeuroScore, der RotaRod, der Elevated Plus Maze-Test und der Water-Maze-Test in die Studie integriert. Um eine Untersucher-Bias zu vermeiden, war der entsprechende Untersucher der neurophysiologischen Testverfahren in Bezug auf die Gruppenzugehörigkeit der Versuchstiere verblindet.

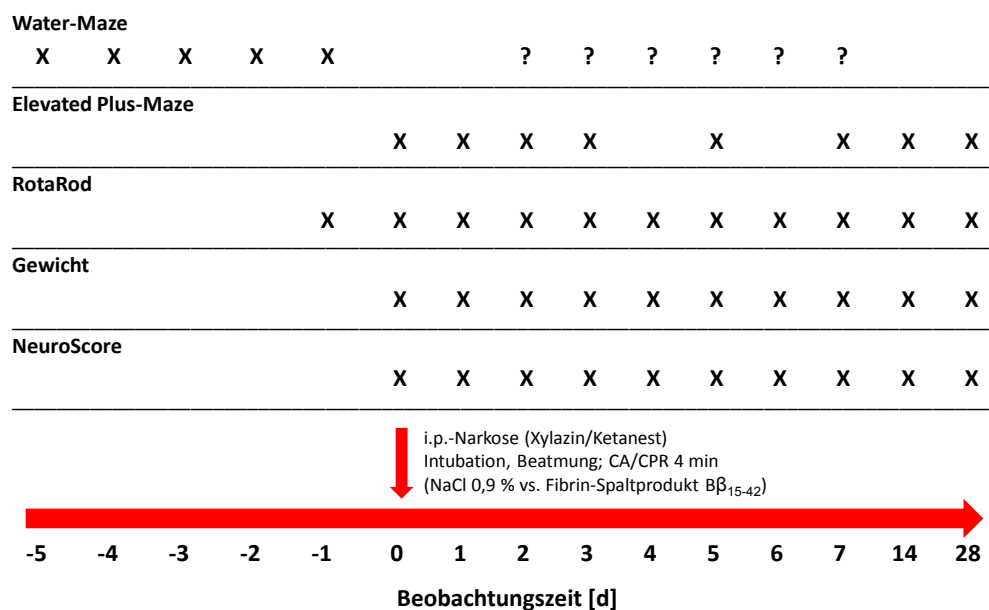


Abb.7: Ablaufschema der neuro-physiologischen Testverfahren über den Beobachtungszeitraum

2.3.1. Körpergewicht

Die Entwicklung des Körpergewichts ist ein sensibler Parameter zur Beurteilung des Allgemeinbefindens. Alle Versuchstiere wurden am Tag der Reanimation (Tag 0), sowie täglich (zur selben Uhrzeit) in den ersten 14 Tagen nach Reanimation und am Tag 28 gewogen (Waage: MXX-212, Denver Instrument, Göttingen, Deutschland).

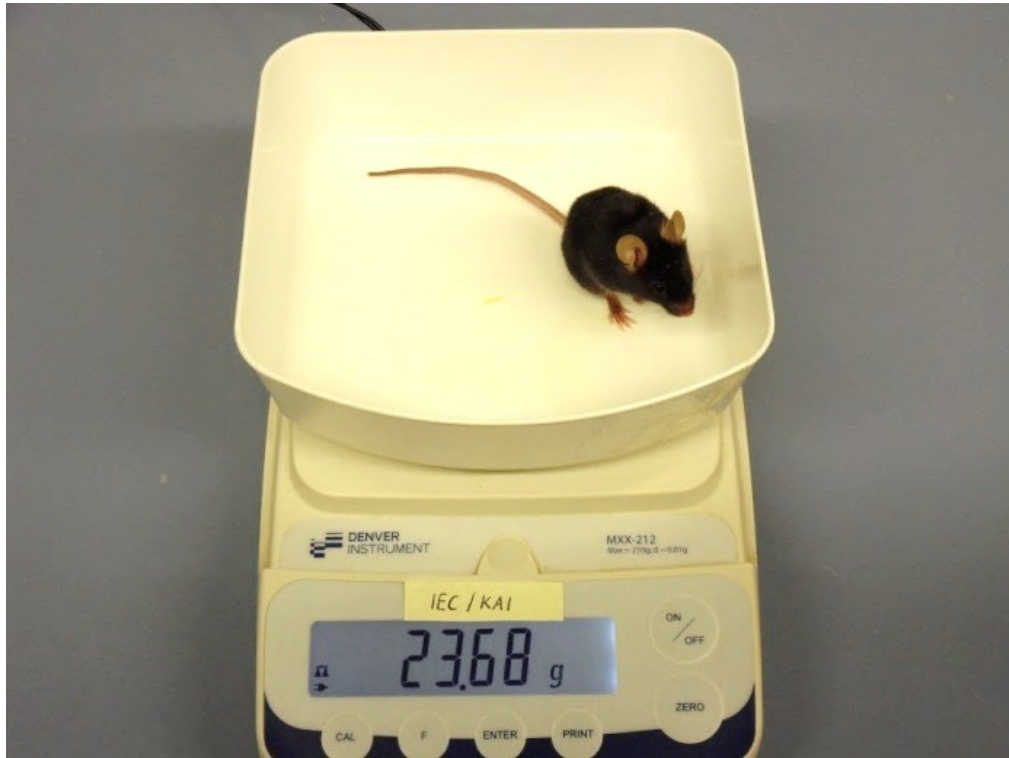


Abb.8: tägliche Messung des Körpergewichts mit Präzisionswaage

2.3.2. NeuroScore

Der NeuroScore wurde nach einem Scoringssystem für Mäuse und Ratten [23] angepasst. Ähnlich wie bei der Glasgow Coma Scale werden für verschiedene Parameter Punkte vergeben und am Ende die Summe der erreichten Punkte ermittelt. Eine Maus kann zwischen 0 und 12 Punkten erreichen. Sind die Tiere gesund und neurologisch unbeeinträchtigt, erreichen sie eine Punktzahl von 12. Die Versuchstiere wurden am Tag der Reanimation sowie an den Tagen 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 14 und 28 mit diesem Instrument eingeschätzt.

Neurological Function Score System - NeuroScore

Vigilanz des Versuchstiers	
1. Keine Reaktion auf Kneifen des Schwanzes	0
2. Verlangsamte Reaktion auf Kneifen des Schwanzes	1
3. Normale Abwehrreaktion	2
Kornealreflex	
1. Kein Blinzeln	0
2. Träges und abgeschwächtes Blinzeln	1
3. Normales Blinzeln	2
Atmung	
1. Unregelmäßiges Atemmuster	0
2. Reduzierte Atemfrequenz, aber normales Atemmuster	1
3. Normale Atmung (Tiefe und Frequenz)	2
Schreitreflex	
1. Kein Umdrehen auf Berührungsreiz	2
2. Verzögertes und abgeschwächtes Umdrehen	1
3. spontane und schnelle Drehung	0
Koordination	
1. Keine spontane Bewegung	0
2. Moderate Ataxie	1
3. Normale Koordination und Bewegung	2
Bewegung / Aktivität	
1. Keine spontane Bewegung	0
2. Schwache / Verlangsamte spontane Bewegung	1
3. Normale Aktivität	2
Maximal mögliche Punktzahl	12

Abb.9: NeuroScore

2.3.3. RotaRod-Test

Der RotaRod-Test ist ein etabliertes und valides Messinstrument zur Untersuchung der groben Kraft, der Koordination, der Ausdauer und des Gleichgewichts des Versuchstieres [24,25]. Er besteht aus einem mit einer konstanten Umdrehung (12,5 U/min) rotierenden Zylinder. Es wird die Zeit gemessen, die ein Tier auf dem Zylinder laufen kann. Für ein gesundes Tier ist es problemlos möglich mehr als 10 - 15 Minuten auf diesem Zylinder zu laufen ohne hinunterzufallen. Um zu verhindern, dass das Testergebnis durch Ausrutschen oder Unachtsamkeit des Tieres negativ beeinflusst wird, wurden die Versuchstiere dreimal für jeweils maximal 5 Minuten auf das RotaRod gesetzt. Zwischen den einzelnen Läufen erhielt das Tier eine Pause von 2 Minuten. Es wurde die Zeit der einzelnen Läufe dokumentiert und addiert. Im Maximum konnte eine Maus eine Zeit von 900 Sekunden (3 x 5 min) erreichen. Zur Eingewöhnung wurde mit diesem Test einen Tag vor der Reanimation begonnen. Die Tiere absolvierten diesen Test außerdem am Tag der Reanimation (Tag 0), sowie an den Tagen 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 14 und 28 nach Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation.

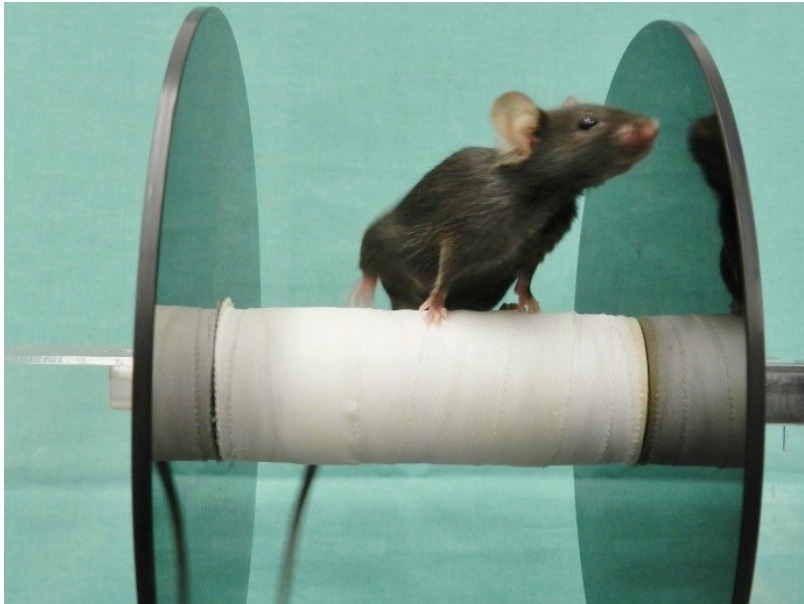


Abb.10: Versuchstier auf dem rotierenden Zylinder des RotaRod

2.3.4. Elevated Plus Maze-Test

Der Elevated Plus Maze-Test ist ein etabliertes verhaltens-physiologisches Messinstrument. Es misst die Aktivität der Versuchstiere, woraus Rückschlüsse auf das Allgemeinbefinden, die Neugier und Ängstlichkeit gezogen werden können. Dieser Test besteht aus einem Kreuz mit zwei „offenen“ und zwei „geschlossenen“ (seitlich begrenzten) Armen. Auf den Armen befinden sich Markierungen in einem Abstand von 10 cm, um die Wegstrecke der Mäuse messen zu können. Das Kreuz ist 60 cm über den Boden aufgebaut, damit die Versuchstiere den Test nicht verlassen können [25]. Die Tiere werden in die Mitte des Kreuzes gesetzt und anschließend für 10 Minuten mit einer Videokamera gefilmt. Ein gesundes und unbeeinträchtigtes Tier ist neugierig und erkundet aktiv seine Umgebung. Es bewegt sich in allen Armen des Kreuzes, wird längere Wegstrecken zurücklegen, sich strecken, sich vermehrt in den offenen Armen aufhalten und über den Rand schauen. Ein Versuchstier in einem reduzierten Allgemeinzustand zeigt ein ängstliches und passives Verhalten. Es wird kürzere Wegstrecken zurücklegen und sich vermehrt in den geschlossenen Armen aufhalten. Die Aufzeichnungen wurden am Tag der Reanimation (Tag 0) begonnen und an den Tagen 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 14 und 28 wiederholt [26,27]. Die ausgewerteten Parameter sind die Zeiten in den offenen und geschlossenen Armen, die zurückgelegten Wegstrecken in den offenen und geschlossenen Armen, sowie die Aufzeichnung, wie oft das Versuchstier über den Rand des offenen Arms geschaut hat bzw. sich (im geschlossenen Arm) an den Wänden aufgerichtet hat.

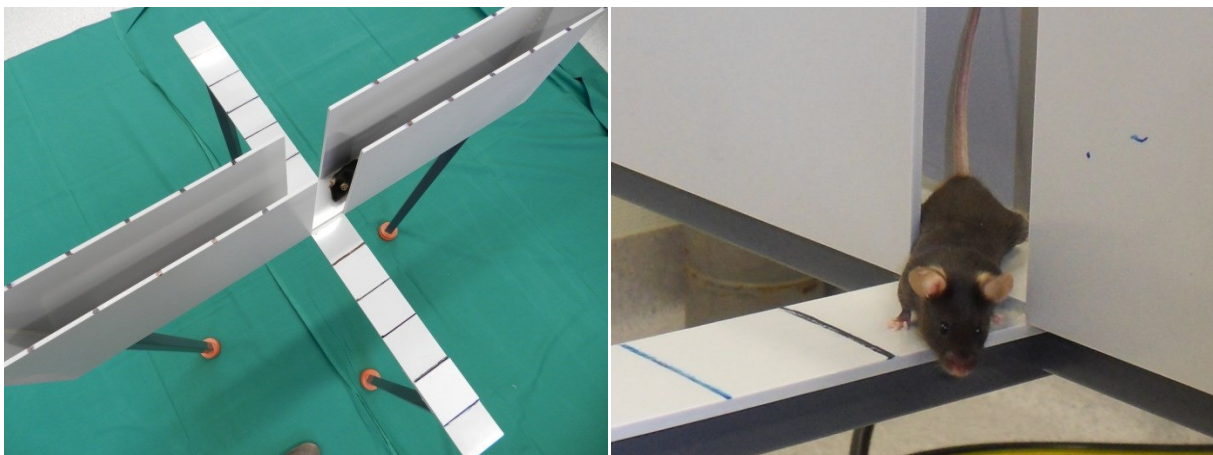


Abb.11 Elevated Pluse Maze-Test

2.3.5. Water-Maze-Test

Der Water-Maze-Test ist ein funktionell-neurologisches Testverfahren mit dem die Gedächtnisleistung der Versuchstiere, vor allem das räumliche Lernen beurteilt werden kann. Der Hippocampus ist wesentlich am räumlichen Lernen beteiligt [28] und gilt daneben als hochgradig anfällig für Hypoxie. Der Water-Maze Test soll zeigen, inwieweit die Versuchstiere in der Lage sind räumlich zu lernen und ob die Versuchstiere nach einem 4-minütigen Herz-Kreislaufstillstand die Fähigkeit haben, sich an das Gelernte zu erinnern. Für den Test wird ein mit Wasser gefüllten Bassin (Durchmesser 80 cm; Wassertiefe 15 cm; Wassertemperatur 24° C) verwendet. Im Becken befindet sich eine Plattform (5 x 5 cm; ca. 1 cm unterhalb der Wasseroberfläche), auf dem die Tiere stehen können, sozusagen „um sich vor dem Ertrinken zu retten“ [29].



Abb.12: Water-Maze-Test, Übersichtsaufnahme des Bassin mit klaren und eingefärbten Wasser

Zusätzlich befinden sich Markierungen hinter der Plattform an der Wand des Bassins sowie frei hängend oberhalb der Plattform. Fünf Tage (Tag -5) vor der geplanten Reanimation werden die Tiere für diesen Test konditioniert. Die Tiere werden immer an derselben Position, mit derselben Orientierung in das Wasser gesetzt. Beim ersten Wasserkontakt schwimmen die Tiere ziellos im Wasser umher und finden die Plattform zufällig. Die Zeit vom Eintritt in das Wasser bis zum Auffinden der Plattform wird gemessen. Nachdem das Tier die Plattform erreicht hat, wird ihm eine Pause von 30 Sekunden gewährt, um sich an den Markierungen an der Beckenwand und oberhalb von ihnen zu orientieren. Die Tiere durchlaufen diesen Test fünf Mal. Am dritten Tag vor Reanimation (Tag -3) werden die Testbedingungen verschärft und das Wasser mit Milch eingefärbt, um zu verhindern, dass die Versuchstiere die

Plattform im Wasser sehen können. Zur Orientierung stehen den Mäusen jetzt nur noch die Markierungen zur Verfügung. Sollte ein Tier nach 120 Sekunden die Plattform nicht erreicht haben, wird es mit sanfter Bewegung zur Plattform bewegt um sich zu orientieren und die Position zu erlernen [29].

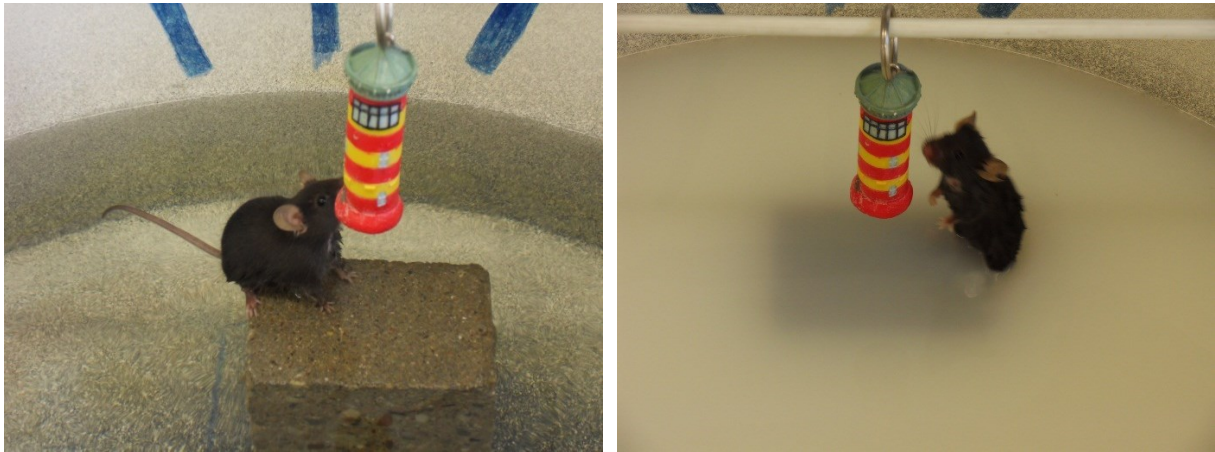


Abb.13: Water-Maze-Test: Versuchstier auf der Plattform

Zur Minimierung der Ertrinkungsgefahr der Versuchstiere aufgrund von allgemeiner Schwäche oder neurologischen Ausfällen wurden Kriterien aufgestellt, die von den Tieren erfüllt sein mussten, um nach der Reanimation wieder am Test teilnehmen zu dürfen. Das Versuchstier musste einen NeuroScore von 12 Punkten (maximales Ergebnis) haben. Der nach Reanimation zu verzeichnende Gewichtsverlust musste gestoppt sein und das Tier musste zugenommen haben. Außerdem musste das Versuchstier über genügend motorische Kraft verfügen und in der Lage sein, mindestens 1 x 5 Minuten auf dem RotaRod zu laufen. Erfüllte das Tier alle genannten Kriterien durfte es am Water-Maze-Test teilnehmen. Dieser Tag ist als Tag X definiert. Die Kriterien wurden an jedem Versuchstag neu überprüft.

2.4. Histologische Aufarbeitungen

Der zweite Abschnitt der Untersuchung diente zur Darstellung des Wirkmechanismus des Fibrin-Spaltproduktes B β ₁₅₋₄₂. Während der Langzeitstudie fiel auf, dass ein wesentlicher Teil, der in den ersten Stunden nach Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation verstorbenen Tiere, ein Lungenödem entwickelt hatten. Aus diesem Grund wurde in den histologischen Nacharbeiten das Hauptaugenmerk auf die Lunge gelegt. Für diese Untersuchung wurden vier weitere Versuchsgruppen installiert.

Die Untersuchungen in den ersten beiden Gruppen (n = 5 pro Gruppe) dienten zur Darstellung des Gefäßendothels und der pulmonal-vaskulären Integrität sowie der Leukozyteninfiltration. Hierfür erfolgte 90 Minuten nach Reanimation die Injektion von 0,2 ml FITC-markierten Lectin (rabbit anti mouse; orb 15902, 1 mg/ml, biorybt, Camebridge, United Kingdom). Lectin bindet sich an intaktes Gefäßendothel und kann so zur Darstellung des Gefäßendothels benutzt werden [30]. 10 Minuten nach Gabe des Lectins wurden die Versuchstiere intravenös mit PBS (Phosphat Buffered Solution) gespült und die Lungenflügel entnommen. Ein Lungenflügel wurde in Stickstoff kryokonserviert und Gefrierschnitte angefertigt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 40, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) mit Grünfilter (Wellenlänge von 510 - 515 nm). Die Auswertung der Daten erfolgte mit einer Bildbearbeitungssoftware (Image Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA). Der zweite Lungenflügel wurde mit Formalin 0,4 % fixiert und Paraffinschnitte angefertigt. Zur qualitativen Beurteilung der interzellulären Barriere und Visualisierung des VE-Cadherin wurde den Paraffinschnitten ein primärer Antikörper gegen VE-Cadherin zugesetzt (goat anti mouse; Santa Cruz: sc-6458, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland) und anschließend der mit Texas Red markierte sekundäre Antikörper (donkey anti goat; Santa Cruz sc-2783, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland) hinzugegeben. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Rotfilter; Wellenlänge: 580 - 590 nm). Zur Sichtbarmachung der Zellkerne wurde eine DAPI-Färbung (4',6-Diamidino-2-phyllindole) durchgeführt und mit UV-Filter bei einer Wellenlänge von 395 - 397 nm am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Des Weiteren wurde an den Paraffinschnitten die Leukozyteninfiltration mittels CAE und HE-Färbung dargestellt.

Bei zwei weiteren Versuchsgruppen (n = 8 pro Gruppe) wurde 8 Stunden nach kardiopulmonaler Reanimation die Leukozyteninfiltration in der Lunge aus Paraffinschnitten mittels CAE- und HE-Färbung dargestellt.

2.5. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit SigmaStat 3.5[®] (SigmaStat for Windows Version 3.5, Systat Software, Inc., Chicago, IL, USA) und SigmaPlot 10.0[®] (SigmaPlot for Windows Version 10.0, Systat Software, Inc., Chicago, IL, USA). Die Überprüfung der Daten auf Normalverteilung erfolgte mittels Kolmogorov-Smirnov-Test. Bei gegebener Normalverteilung wurde der Student's-t-Test durchgeführt. Bei nicht gegebener Normalverteilung der Daten wurde die statistische Signifikanz mittels Rangsummen-Test nach Mann Whitney überprüft. Zur Auswertung der teilnehmenden Versuchstiere am Water-Maze-Test wurde der χ^2 -Test verwendet. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung bzw. als Median und Interquartilenabstände dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der Langzeituntersuchung

In die Langzeitstudie für das Überleben und die funktionell-neurologische Regeneration wurden 60 Tiere eingeschlossen. 30 Tiere erhielten Kochsalzinjektionen, 30 Tiere erhielten das Fibrin-Spaltprodukt B β ₁₅₋₄₂ zu Beginn der Reanimation. 8 Versuchstiere mussten aufgrund von Problemen während der chirurgischen Präparation oder der Reanimation (erhöhter Blutverlust, Venenabriss, akzidentielle Extubation, Katheterdislokation unter Reanimation) ausgeschlossen werden. Bei allen Tieren konnte nach Reanimation ein Spontankreislauf erreicht werden (ROSC 100%).

Ausgangsbedingungen vor Induktion des Kreislaufstillstands		
	CA/CPR - NaCl 0,9 % n = 26	CA/CPR - B β ₁₅₋₄₂ n = 26
Körpergewicht [g]	26,9 ± 0,67	27,7 ± 0,56
HF [1/min]	232 ± 6	222 ± 5
MAP [mm Hg]	111 ± 3	103 ± 4
Temperatur [°C]	36,0 ± 0,1	36,0 ± 0,1
Parameter der kardiopulmonalen Reanimation		
	CA/CPR - NaCl 0,9 % n = 26	CA/CPR - B β ₁₅₋₄₂ n = 26
Zeit bis ROSC [s]	64 ± 26	56 ± 29
Dosis Adrenalin [µg]	12,0 ± 1,0	12,5 ± 1,5
Zeit bis Extubation [min]	144 ± 30	147 ± 18

Tabelle 2: Vitalwerte aller Versuchstiere vor Induktion des Herz-Kreislaufstillstandes und die Parameter der kardiopulmonalen Reanimation; Mittelwert ± SD

1 h nach erfolgreicher Reanimation		
	CA/CPR - NaCl 0,9 % n = 26	CA/CPR - B β ₁₅₋₄₂ n = 26
HF [1/min]	385 ± 60	410 ± 39
MAP [mm Hg]	85 ± 6	85 ± 4
Temperatur [°C]	35,9 ± 0,1	36,0 ± 0,1
2 h nach erfolgreicher Reanimation		
	CA/CPR - NaCl 0,9 % n = 26	CA/CPR - B β ₁₅₋₄₂ n = 26
HF[1/min]	198 ± 12	235 ± 34
MAP [mm Hg]	75 ± 6	80 ± 4
Temperatur [°C]	35,9 ± 0,1	36,0 ± 0,1

Tabelle 3: Vitalwerte aller Versuchstiere 1 h und 2 h nach Reanimation, Mittelwert ± SD

3.1.1. Überleben

In der Kontrollgruppe starben innerhalb der ersten 24 Stunden 27 % der reanimierten Versuchstiere (7 Tiere von 26). Nach 72 Stunden waren 42 % der Tiere verstorben (11 Tiere von 26), nach 7 Tagen 69 % (18 Tiere von 26), nach 14 Tagen 77 % (20 Tiere von 26) und nach 28 Tagen 81 % (21 Tiere von 26).

In der CA/CPR - B β ₁₅₋₄₂ - Gruppe war die Sterblichkeit in den ersten 14 Tagen geringer ($p < 0,05$). Nach 24 Stunden waren 4 % der Tiere (1 Tier von 26) verstorben, nach 72 Stunden 12 % (3 Tiere von 26), nach 7 Tagen 42 % (11 Tiere von 26), nach 14 Tagen 58 % (15 Tiere von 26) und nach 28 Tagen 73 % (19 Tiere von 26).

Nach 28 Tagen war der Überlebensvorteil in der Therapiegruppe nicht mehr nachzuweisen.

In der Kontrollgruppe starben drei Versuchstiere vor der Extubation. Alle drei Tiere entwickelten ein schweres Lungenödem. Bei zwei der drei Tiere traten in der Folge

maligne Herzrhythmusstörungen auf. In der Behandlungsgruppe verstarb kein Tier in den ersten 18 Stunden.

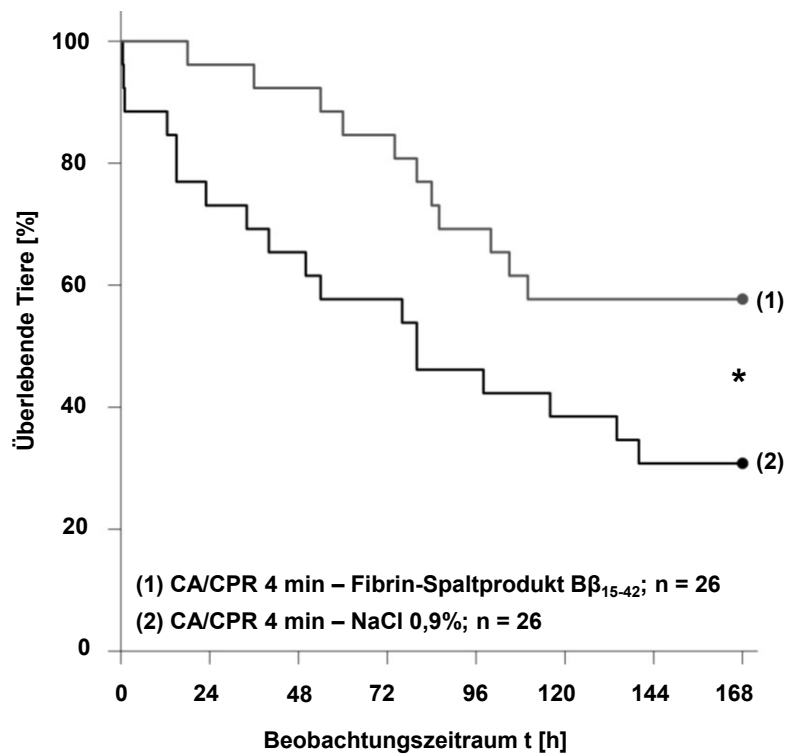


Abb.14 Überleben der Versuchstiere , Beobachtungszeitraum 7 Tage, Statistik: Kaplan-Meier logrank Analyse, * $p < 0,05$

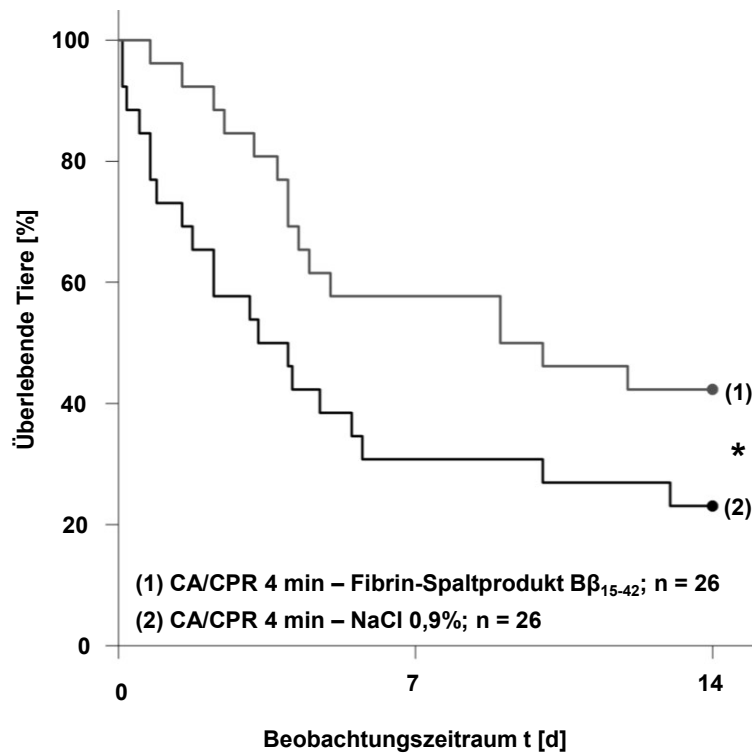


Abb.15 Überleben der Versuchstiere, Beobachtungszeitraum 14 Tage, Statistik: Kaplan-Meier logrank Analyse, * $p < 0,05$

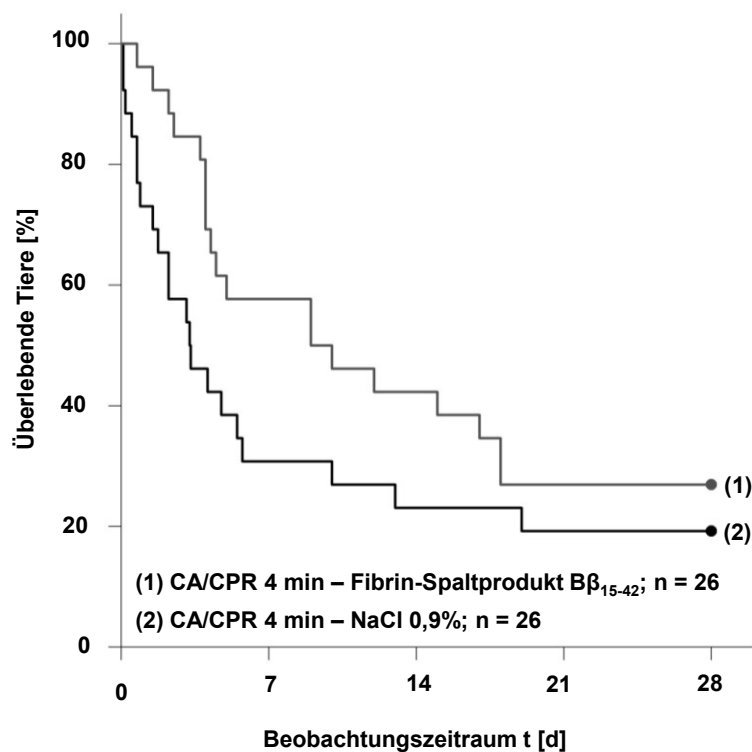


Abb.16: Überleben der Versuchstiere, Beobachtungszeitraum 28 Tage, Statistik: Kaplan-Meier logrank Analyse

3.1.2 Körpergewicht / neurophysiologische Testverfahren

3.1.2.1. Körpergewicht

Das Ausgangsgewicht am Tag der Reanimation (Tag 0) war in beiden Gruppen gleich (CA/CPR - B β ₁₅₋₄₂: 28,3 g [25,3 - 29,1] vs. CA/CPR - NaCl 0,9 %: 27,3 g [20,2 - 28,8]). In den ersten 3 Tagen nach Reanimation verloren die Versuchstiere bis zu 15 % ihres Ausgangsgewichtes. In den darauffolgenden Tagen erholte sich bei allen überlebenden Tieren das Körpergewicht wieder auf das Ausgangsniveau. In der Dynamik des Gewichtsverlustes und der Erholung zeigte sich kein Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen.

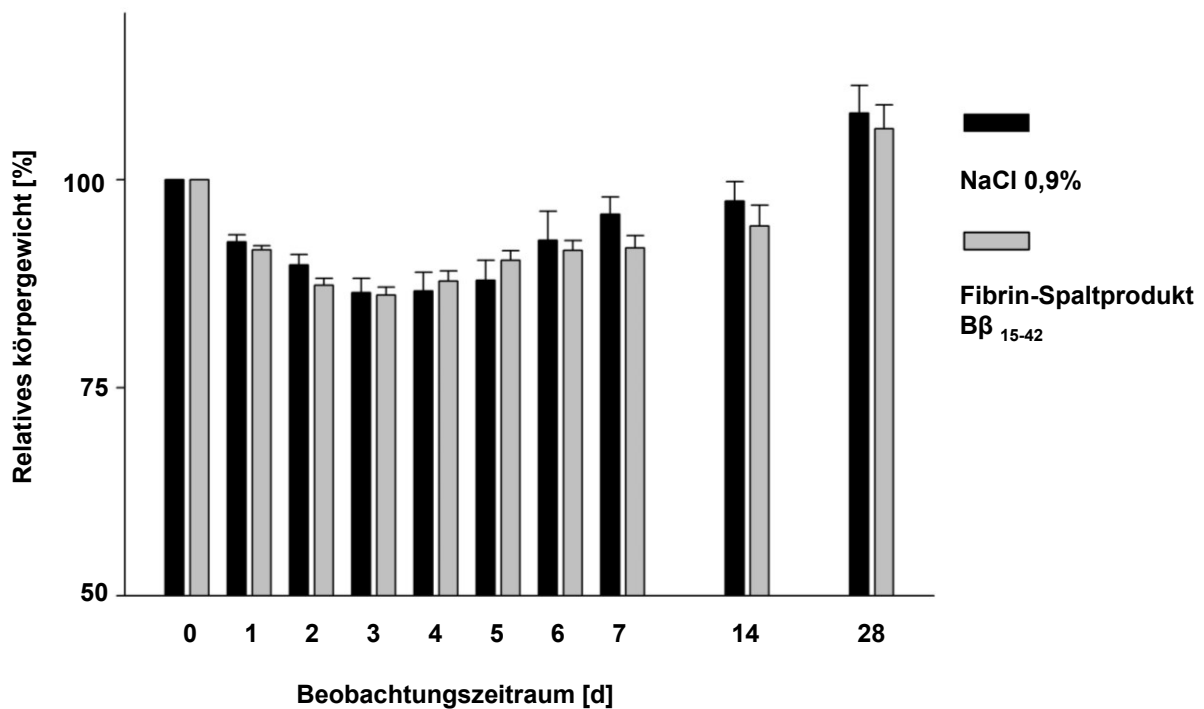


Abb.17: Verlauf des relativen Körpergewichtes der Versuchstiere, Tag 0 = 100 %, Beobachtungszeitraum 28 Tage, Mittelwerte \pm SD

<u>Körpergewicht</u> (relativ) in [% vom Ausgangsgewicht]		
	CA/CPR - NaCl 0,9 % n = 26	CA/CPR - B β ₁₅₋₄₂ n = 26
Tag 0	100	100
Tag 1	93,4 ± 3,75	91,9 ± 2,45
Tag 2	89,5 ± 5,34	87,9 ± 4,14
Tag 3	87,3 ± 6,64	86,7 ± 4,58
Tag 4	87,3 ± 7,79	88,9 ± 4,96
Tag 5	89,0 ± 8,02	90,9 ± 4,43
Tag 6	90,2 ± 10,47	91,4 ± 4,40
Tag 7	93,4 ± 5,87	90,6 ± 5,45
Tag 14	98,4 ± 6,21	91,9 ± 7,59
Tag 28	107,4 ± 6,58	104,1 ± 9,78

Tabelle 4: Körpergewicht der Versuchstiere, Beobachtungszeitraum 28 Tage, Mittelwert ± SD;
Statistik: Student's-t-Test

3.1.2.2. NeuroScore

Am Tag 0, unmittelbar vor der Reanimation, erreichten alle Versuchstiere im NeuroScore eine Punktzahl von 12. Am Tag 1 betrug der NeuroScore der Versuchstiere in beiden Gruppen 11 Punkte (CA/CPR - B β ₁₅₋₄₂: 11 [10 - 12] vs. CA/CPR - NaCl 0,9 %: 11 [10 - 12]). Ab dem 2. Nachbeobachtungstag lag der NeuroScore in beiden Versuchsgruppen wieder bei 12 Punkten (CA/CPR - B β ₁₅₋₄₂: 12 [10-12] vs. CA/CPR - NaCl 0,9 %: 12 [10 - 12]). Zwischen den Versuchsgruppen bestand zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied.

<u>Neuro Score</u> (max. 12 Punkte)		
	CA/CPR - NaCl 0,9 % n = 26	CA/CPR - B β ₁₅₋₄₂ n = 26
Tag 0	12[12 - 12]	12[12 - 12]
Tag 1	11[10 - 12]	11[10 - 12]
Tag 2	12[10 - 12]	12[10 - 12]
Tag 3	12[10 - 12]	12[10 - 12]
Tag 5	12[12 - 12]	12[12 - 12]

Tabelle 5: Ergebnisse NeuroScore, Beobachtungszeitraum 28 Tage, Median [25 – 75 Perzentile]
Statistik: Student's-t-Test

3.1.2.3. RotaRod

Am Tag der Reanimation waren alle Versuchstiere in der Lage im Median 900 Sekunden 797 [532 - 900] auf dem RotaRod zu laufen. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Die Ergebnisse der Nachbeobachtungstage sind in Tabelle 5 dargestellt. Am ersten Tag nach Reanimation konnten die Versuchstiere der B β ₁₅₋₄₂ -Gruppe tendenziell länger auf dem RotaRod verweilen (CA/CPR - B β ₁₅₋₄₂: 450 s [113 - 820] vs. CA/CPR - NaCl 0,9 %: 263 s [51 - 739]). Dieser Trend zwischen den Versuchsgruppen war bis zum 5. Nachbeobachtungstag nachweisbar. Eine statistische Signifikanz erreichte dieser Unterschied allerdings zu keinem Zeitpunkt.

<u>RotaRod</u> Zeit [s]		
	CA/CPR - NaCl 0,9 % n = 26	CA/CPR - B β ₁₅₋₄₂ n = 26
Tag 0	900 [758 - 900]	900 [832 - 900]
Tag 1	263 [51 - 739]	450 [113 - 820]
Tag 2	363 [13 - 656]	510 [181 - 775]
Tag 3	358 [113 - 587]	429 [108 - 677]
Tag 5	670 [423 - 897]	816 [755 - 900]
Tag 7	763 [622 - 900]	775 [590 - 900]
Tag 14	900 [818 - 900]	900 [815 - 900]
Tag 28	900 [900 - 900]	900 [900 - 900]

Tabelle 6: Ergebnisse RotaRod-Test, Beobachtungszeitraum 28 Tage, Median [25 – 75 Perzentile]
Statistik: Student's-t-Test

3.1.2.4. Elevated Plus Maze-Test

Am Tag der Reanimation zeigten die Tiere beider Versuchsgruppen das gleiche Verhalten. Sie hielten sich überwiegend in den geschlossenen Armen auf, legten dort jeweils eine große Strecke zurück und erkundeten über ein Aufrichten an den Wänden der geschlossenen Arme die Umgebung. Zu einem deutlich geringeren Anteil bewegten sie sich auf den offenen Arme und erkundeten hier die Umgebung über ein Senken des Kopfes über den Rand der offenen Arme. Ein Unterschied zwischen den Gruppen konnte nicht nachgewiesen werden. In den ersten Tagen nach der Reanimation hielten sich die Tiere beider Versuchsgruppen mehr in den geschlossenen Armen auf, legten kaum Strecke zurück und erkundeten nur wenig ihre Umgebung. Ab Tag 5 lagen die Parameter wieder auf dem Ausgangsniveau. Auch hier ließ sich kein Unterschied zwischen den Gruppen nachweisen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 und 8 dargestellt.

<u>Elevated Plus Maze</u>		
	CA/CPR - NaCl 0,9 % n = 26	CA/CPR - B β ₁₅₋₄₂ n = 26
Tag 0		
Distanz geschlossener Arm [cm]	1730 [1250 - 2035]	1640 [1345 - 2373]
Distanz offener Arm [cm]	170 [100 - 365]	260 [165 - 430]
Zeit im geschlossenen Arm [s]	545 [515 - 552]	483 [444 - 528]
Zeit im offenen Arm [s]	56 [48 - 81]	117 [73 - 159]
Aufrichten	28 [21 - 33]	23 [19 - 36]
Kopf über den Rand	8 [7 - 12]	15 [8 - 19]
Tag 1		
Distanz geschlossener Arm [cm]	710 [205 - 1530]	320 [45 - 1250]
Distanz offener Arm [cm]	45 [5 - 200]	0 [0 - 25]
Zeit im geschlossenen Arm [s]	582 [564 - 593]	600 [591 - 600]
Zeit im offenen Arm [s]	19 [8 - 36]	0 [0 - 9]
Aufrichten	0 [0 - 20]	0 [0 - 14]
Kopf über den Rand	2 [1 - 4]	0 [0 - 1]
Tag 2		
Distanz geschlossener Arm [cm]	380 [70 - 420]	180 [80 - 660]
Distanz offener Arm [cm]	20 [0 - 35]	0 [0 - 155]
Zeit im geschlossenen Arm [s]	597 [595 - 600]	598 [578 - 600]
Zeit im offenen Arm [s]	3 [0 - 5]	2 [0 - 22]
Aufrichten	1 [0 - 14]	4 [0 - 14]
Kopf über den Rand	0 [0 - 3]	0 [0 - 3]
Tag 3		
Distanz geschlossener Arm [cm]	240 [60 - 625]	300 [60 - 555]
Distanz offener Arm [cm]	0 [0 - 53]	80 [0 - 220]
Zeit im geschlossenen Arm [s]	600 [594 - 600]	572 [553 - 600]
Zeit im offenen Arm [s]	0 [0 - 6]	28 [0 - 47]
Aufrichten	5 [0 - 8]	6 [0 - 8]
Kopf über den Rand	0 [0 - 1]	3 [0 - 6]

Tabelle 7: Ergebnisse Elevated Plus Maze; Tag 0 – 3; Median [25 – 75 Perzentile]; Statistik: Student's-t-Test

<u>Elevated Plus Maze</u>		
	CA/CPR - NaCl 0,9 % n = 26	CA/CPR - B β ₁₅₋₄₂ n = 26
Tag 5		
Distanz geschlossener Arm [cm]	1840 [890 - 2005]	1600 [1340 - 2040]
Distanz offener Arm [cm]	120 [75 - 165]	285 [220 - 360]
Zeit im geschlossenen Arm [s]	579 [554 - 579]	550 [536 - 556]
Zeit im offenen Arm [s]	21 [21 - 47]	50 [44 - 64]
Aufrichten	22 [15 - 47]	18 [15 - 20]
Kopf über den Rand	4 [4 - 9]	8 [5 - 9]
Tag 7		
Distanz geschlossener Arm [cm]	1040 [845 - 1250]	870 [810 - 920]
Distanz offener Arm [cm]	140 [65 - 185]	90 [40 - 100]
Zeit im geschlossenen Arm [s]	560 [555 - 580]	586 [575 - 590]
Zeit im offenen Arm [s]	40 [21 - 42]	14 [10 - 25]
Aufrichten	19 [10 - 24]	13 [7 - 15]
Kopf über den Rand	4 [3 - 6]	2 [1 - 4]
Tag 14		
Distanz geschlossener Arm [cm]	1900 [1360 - 2530]	1560 [750 - 1815]
Distanz offener Arm [cm]	240 [120 - 300]	160 [60 - 220]
Zeit im geschlossenen Arm [s]	557 [547 - 571]	572 [567 - 587]
Zeit im offenen Arm [s]	43 [29 - 53]	28 [13 - 34]
Aufrichten	22 [20 - 23]	22 [9 - 27]
Kopf über den Rand	7 [5 - 7]	4 [2 - 5]
Tag 28		
Distanz geschlossener Arm [cm]	1760 [1595 - 2485]	1840 [1660 - 2020]
Distanz offener Arm [cm]	140 [95 - 320]	180 [160 - 200]
Zeit im geschlossenen Arm [s]	558 [533 - 562]	556 [560 - 572]
Zeit im offenen Arm [s]	42 [38 - 68]	34 [28 - 40]
Aufrichten	19 [18 - 26]	25 [15 - 34]
Kopf über den Rand	7 [5 - 7]	4 [2 - 6]

Tabelle 8: Ergebnisse Elevated Plus Maze; Tage 5, 7, 14 und 28; Median [25 – 75 Perzentile]
Statistik: Student's-t-Test

3.1.2.5. Water-Maze-Test

Alle Versuchstiere waren in der Lage das Schwimmen und die Position der Plattform zu erlernen. Es gab keine Verluste von Versuchstieren aufgrund von Ertrinken, Erschöpfung oder Stress. Bei allen Tieren zeigte sich ein Lernprozess im Auffinden der Plattform vom Tag -5 (vor Reanimation) bis zum Tag -1. Beim ersten Kontakt benötigten die Versuchstiere im Median 16 s [8 - 23] zum Auffinden der Plattform. Am Tag vor der Reanimation (Tag -1) wurde die Plattform von den Tieren nach 6 s [3 - 12] gefunden. Bei retrospektiven Zuteilen der Tiere zu der Behandlungsgruppe oder Kontrollgruppe (zum Zeitpunkt des Erlernens dieses Tests waren die Tiere noch nicht randomisiert) konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. In der Kontrollgruppe benötigten die Versuchstiere am Tag -5 14 s [8 - 21] um die Plattform zu finden. In der Behandlungsgruppe fanden die Tiere die Plattform in 17 s [19 - 24] am Tag -5. Am Tag vor der Reanimation (Tag -1) benötigten die Tiere der Kontrollgruppe 7 s [4 - 15] und die Tiere der Behandlungsgruppe 6 s [3 - 12]. Am Tag der Reanimation wurde der Test nicht durchgeführt, um die Tiere nicht zusätzlich einem Stressfaktor auszusetzen. Nachdem die Tiere alle vorher genannten Voraussetzungen erfüllten, durften sie nach der Reanimation wieder an den Test teilnehmen. Alle teilnehmenden Versuchstiere waren in der Lage nach der Reanimation die Plattform genauso schnell zu finden, wie am Tag vor der Reanimation. Jedoch erfüllten die Versuchstiere der Kontrollgruppe die Voraussetzungen zur Teilnahme am Water-Maze Test im Median erst am Tag 5 [4 - 5] nach Reanimation, während die Versuchstiere der Therapiegruppe diese Voraussetzungen bereits am Tag 3 [2 - 5] erfüllten. Außerdem waren in der Kontrollgruppe nur 9 von 26 Tieren (34,6 %) überhaupt in der Lage wieder am Water-Maze Test teilzunehmen. In der Therapiegruppe erfüllten nach Reanimation dagegen 15 von 26 Tieren (58 %) die Voraussetzungen zur Teilnahme an den Test (χ^2 -Test, $p < 0,05$).

<u>Water-Maze-Test</u>		
	CA/CPR - NaCl 0,9 % n = 26	CA/CPR - B β ₁₅₋₄₂ n = 26
Lernphase vor CA/CPR	Zeit in s - Median [25 - 75 Perzentile]	
erster Kontakt (Tag -5)	16 [8 - 23]	
Tag vor Reanimation (Tag -1)	6 [3 - 12] *	
Teilnahme am Test nach CA/CPR (überlebende Tiere; Eingangskriterien)		
Teilnehmer nach CA/CPR		
n [%]	9/26 [34,6]	15/26 [57,7] *
frühestmöglicher Tag der Teilnahme am Test	Zeit in d - Median [25 - 75 Perzentile]	
(Tag X)	5 [4 - 5]	3 [2 - 5] *
Test nach CA/CPR	Zeit in s - Median [25 - 75 Perzentile]	
erster Versuch nach Reanimation (Tag X)	5 [3 - 6]	8 [3 - 12]

Tabelle 9: Ergebnisse Water-Maze-Test, Statistik: Student's-t-Test, χ^2 -Test; * $p < 0,05$

3.2. Ergebnisse der Kurzzeituntersuchung

3.2.1. Immunhistologische Untersuchungen und Histologie der Lunge (nach 1,5 und 8 h)

In der Therapiegruppe war 1,5 h nach CA/CPR im Vergleich zur Kontrollgruppe eine längere Strecke an intaktem FITC-gefärbtem Endothel pro Gesichtsfeld zu beobachten (CA/CPR – B β ₁₅₋₄₂: 8592 ± 1522 vs. CA/CPR - NaCl 0,9 %: $5651 \pm 2127 \mu\text{m}/\text{mm}^2$, $p < 0,05$). Das VE-Cadherin war bei dem Fibrin-Spaltprodukt B β ₁₅₋₄₂ behandelten Tieren als Struktur abgrenzbar, wohingegen bei den Kontrolltieren nur noch eine diffuse zelluläre Anfärbung zu beobachten war, die eine Abgrenzung von Strukturen nicht mehr zuließ.

In der mit dem Fibrin-Spaltprodukt B β ₁₅₋₄₂ behandelten Tieren zeigte sich 1,5 h nach Reanimation eine geringere Leukozyteninfiltration im Lungengewebe im Vergleich zu den Kontrolltieren (CA/CPR – B β ₁₅₋₄₂: 37 [27 - 45] vs. CA/CPR – NaCl 0,9 %: 51 [42 - 62] Leukozyten/ high powered field Lungengewebe, $p < 0,05$). Dieses Ergebnis zeigte sich auch 8 h nach Reanimation (CA/CPR - B β ₁₅₋₄₂: 48 [35 - 61] vs. CA/CPR -NaCl 0,9 %: 60 [44 - 61] Leukozyten/ high powered field Lungengewebe, $p < 0,05$).

Parameter	Gruppe	
	CA/CPR - NaCl 0,9 % n = 5	CA/CPR - B β ₁₅₋₄₂ n = 5
intaktes Endothel - pulmonal 1,5 h nach Reanimation (FITC-Lectin)	[$\mu\text{m}/\text{mm}^2$] - Mittelwert \pm SD - je 6 Gesichtsfelder 5651 [\pm 2127] 8592 [\pm 1522] $p < 0,05$	
Leukozyteninfiltration - pulmonal 1,5 h nach Reanimation Histologie - CAE	Gruppe CA/CPR - NaCl 0,9 % CA/CPR - Bβ₁₅₋₄₂ n = 5 n = 5 Leukozyten/HPF - Median [25 - 75 Perzentile] je 50 Gesichtsfelder pro Tier 51 [42 - 61] 37 [27 - 45] $p < 0,05$	
Leukozyteninfiltration - pulmonal 8 h nach Reanimation Histologie - CAE	Gruppe CA/CPR - NaCl 0,9% CA/CPR - Bβ₁₅₋₄₂ n = 8 n = 8 Leukozyten/HPF - Median [25 - 75 Perzentile] je 50 Gesichtsfelder pro Tier 60 [44 - 75] 48 [35 - 61] $p < 0,05$	

Tabelle 10: Leukozyteninfiltration der Lunge nach 1,5 h und 8h, Statistik: Student's t-Test

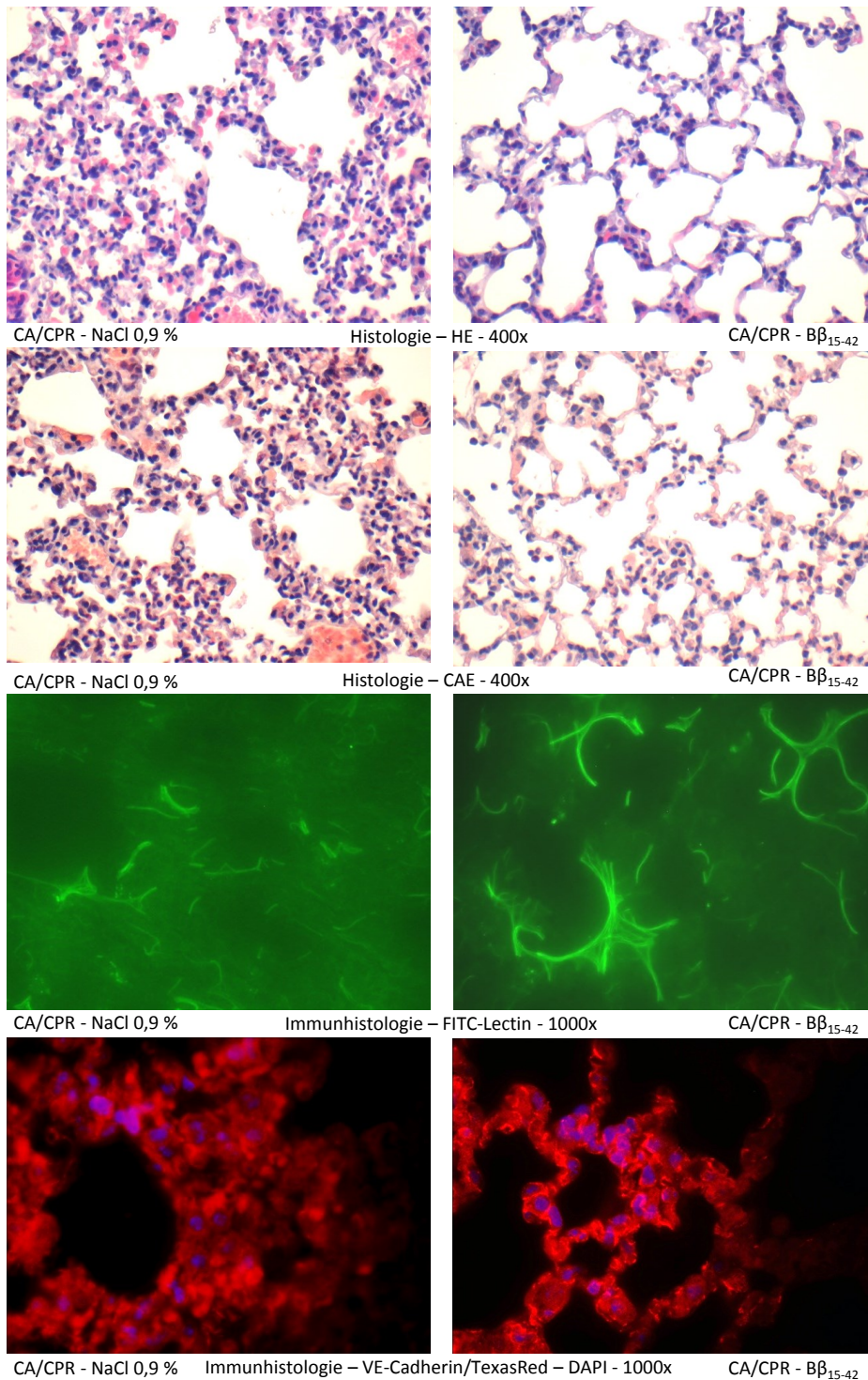


Abb.18: Exemplarische Darstellung der histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen. Es ist jeweils ein Tier aus der Kontrollgruppe (CA/CPR - NaCl 0,9 %) auf der linken Seite und aus der Behandlungsgruppe (B β ₁₅₋₄₂) auf der rechten Seite dargestellt. Erste und zweite Zeile: Leukozyteninfiltration 8 h nach CA/CPR mit HE und CAE-Färbung (400fache Vergrößerung): deutlich zu sehen sind die breiten Membranen, kollabierten Alveolen und Fibrinexsudation in der Kontrollgruppe (erste Zeile) sowie die verminderte Leukozyteninfiltration pulmonal in der Therapiegruppe (zweite Zeile); dritte Zeile (1000fache Vergrößerung): Darstellung des intakten Endothels in der pulmonalen Strombahn. In der Behandlungsgruppe sieht man längere Strecken von intaktem Endothel. Vierte Zeile: mit Texas-Red Färbung (1000fache Vergrößerung) dargestelltes VE-Cadherin: deutlich mehr intaktes VE-Cadherin in der Behandlungsgruppe im Gegensatz zur Kontrollgruppe mit aufgelockerten Zellmembranen

3.3. Nebenfunde

Alle akut verstorbenen Tiere wurden autopsiert und makroskopisch betrachtet. Makroskopisch ließen sich keine offensichtlichen schweren Schädigungen an lebenswichtigen Organen, wie Herz, Leber und Lunge feststellen. Allerdings zeigten viele Tiere, die nach dem 8. Tag verstorben waren, eine auffällig große Harnblase.



Abb.19: obstruktive Harnblase

Histologisch zeigte sich ein buntes Bild an Pathologien, das keinen eindeutigen Trend zeigte. So waren Schäden an Leber (ischämische Hepatitis) und pneumonische Infiltrate in der Lunge zu beobachten.

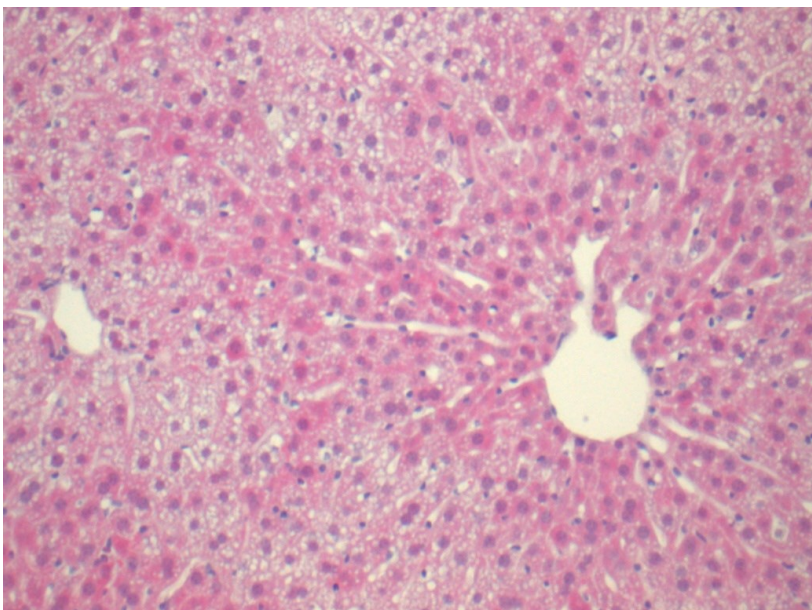


Abb.20: exemplarische Darstellung histologischer Nebenfunde (HE-Färbung, 100fache Vergrößerung): ischämische Hepatitis, nach CA/CPR

Bei ausgewählten Tieren wurde eine Aufarbeitung des Gehirns vorgenommen. Dabei zeigten sich bei einigen Tieren eine Ausdünnung der Nervenzellen in der gesamten Hippocampusregion sowie eine Vacuolisierung der Zellen, v.a in der CA-1-Region des Hippocampus. Diese Veränderungen waren auch bei Tieren zu beobachten, die keine motorischen Defizite aufwiesen. Allerdings zeigten sich auch Normalbefunde bei Tieren, die ein offensichtliches motorisches Defizit aufwiesen. Da es sich nur um ausgewählte Tiere handelte, ist eine statistische Aufarbeitung der Ergebnisse nicht möglich.

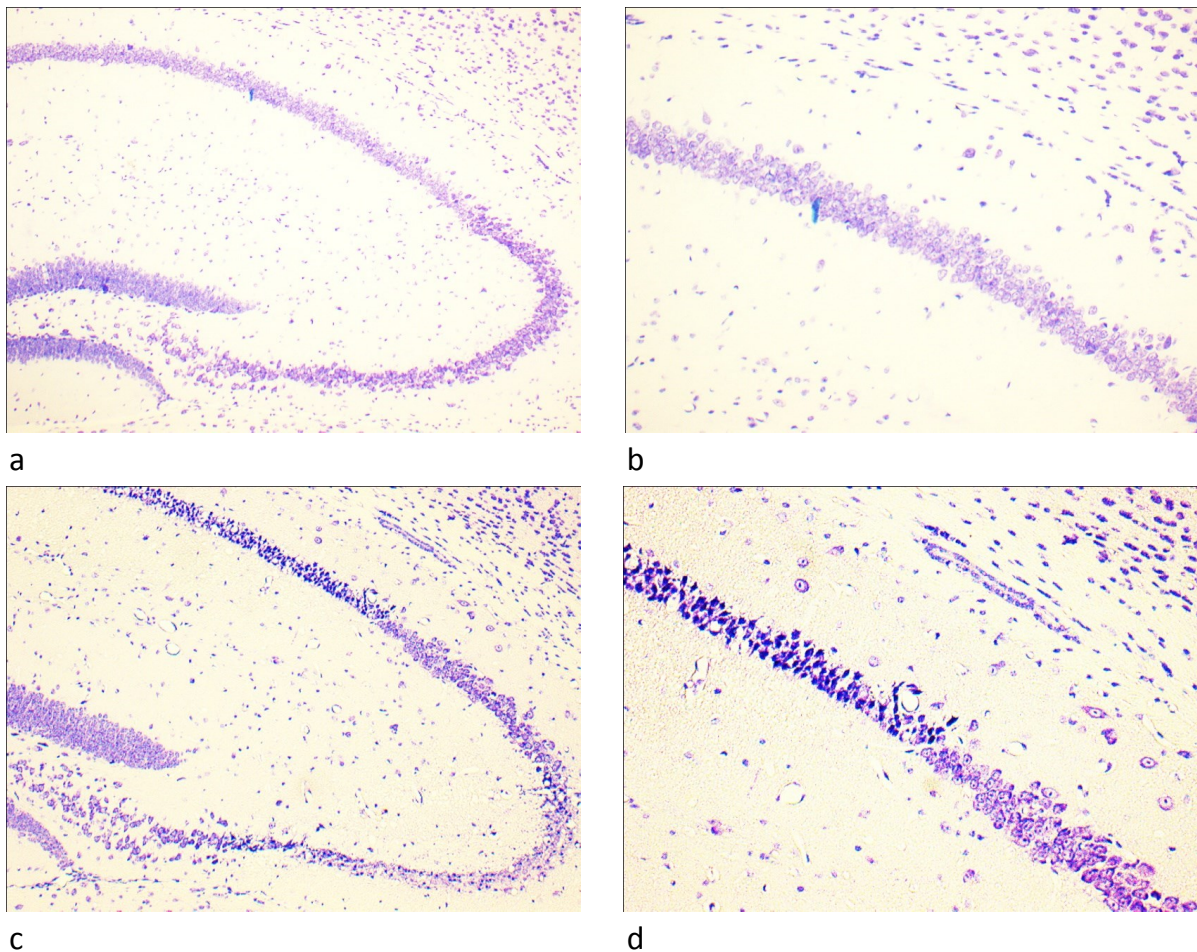


Abb. 21: exemplarische Darstellung des Hippocampus retrocommissuralis (Nissl-Färbung); a: gesundes Tier (100fache Vergrößerung); b: CA-1-Region des Hippocampus beim gesunden Tier (200fache Vergrößerung); c und d: 5 Tage nach CA/CPR, Tier mit ausgeprägter Paresis der Hinterläufe; c: Man sieht eine Verschmälerung der Zellreihen im Cornu ammonis (100fache Vergrößerung); d: (200fache Vergrößerung) Vakuolisierung in der CA-1-Region im Sinne einer Apoptose (mit freundlicher Unterstützung von Prof. Wree, Anatomisches Institut der Universität Rostock)

4. Diskussion

Der Herz-Kreislaufstillstand stellt nach wie vor eine große medizinische und sozioökonomische Herausforderung dar. Über 500.000 Menschen erleiden in Europa und Nordamerika jährlich einen Herz-Kreislaufstillstand. 20 – 50 % dieser Patienten erreichen ein ROSC. Nur 2 – 15 % der primär erfolgreich reanimierten Patienten verlassen lebend das Krankenhaus, wovon 40 – 50 % der Patienten einen bleibenden neurologischen Schaden davontragen [31]. Von 500.000 Patienten, die einen Herz-Kreislaufstillstand erlitten haben, sind nur ca. 2.500 Menschen in der Lage ein eigenständiges und selbstbestimmtes Leben zu führen. Die erste große Multicenterstudie zum Herz-Kreislaufstillstand wurde 1953 veröffentlicht und zeigte eine ROSC-Rate („deren Herz wiederbelebt werden konnte“) von 50 % [32]. Trotz intensiver Forschungsarbeit konnte in den letzten 60 Jahren weder die Überlebensrate noch die funktionell-neurologische Regeneration verbessert werden. Die therapeutischen Strategien, die bisher zu einer Verbesserung des Überlebens und der funktionell-neurologischen Regeneration geführt haben, sind präklinisch die konsequente Schulung von Laien in den Basismaßnahmen der Reanimation und die Vorhaltung von AED an viel frequentierten Orten. In der Klinik konnte für die milde therapeutische Hypothermie, die rasche perkutane Koronarintervention und die frühzeitige hämodynamische Stabilisierung eine Verbesserung des Überlebens und der funktionell-neurologischen Regeneration gezeigt werden [3].

Aufgrund dieser geringen Überlebensraten und des schlechten neurologischen Outcomes der Patienten nach Herz-Kreislaufstillstand stellt dieses nach wie vor nicht nur ein großes medizinisches Problem dar, sondern ist auch ein immenses sozioökonomisches Problem. Es bedeutet oft jahrelange Rehabilitationsmaßnahmen und Pflegebedürftigkeit für die Patienten und eine große Belastung für die Familien und das soziale Umfeld dieser Patienten. Aus diesem Grund ist eine intensive Forschungsarbeit zur Aufklärung von Mechanismen und Entwicklung von therapeutischen Ansätzen wichtig.

Das Tierexperiment ist ein unverzichtbares Instrument in der Grundlagenforschung. Ratten- und Mäusemodelle sind zur Grundlagenforschung zum Herz-Kreislaufstillstand geeignet, da sie mit geringen Kosten verbunden sind und die klinische Situation in diesen Modellen reproduzierbar ist [33]. Die Physiologie des kardiopulmonalen Systems von Ratten und Mäusen sind unter Modellbedingungen

mit denen des Menschen ausreichend gut vergleichbar. Die unter Reanimation gemessenen hämodynamischen Parameter wie Aortendruck, koronarer Perfusionsdruck und endtidale CO₂-Konzentration entsprechen annähernd den bei Großtieren und am Menschen etablierten Schwellenwerten für eine erfolgreiche Reanimation [34,35]. Die Postreanimationserkrankung mit allen Symptomen und Auswirkungen auf den Organismus lässt sich in ihrer Komplexität weder an Computermodellen, noch an Zellkulturen oder Einzelorganpräparationen simulieren und untersuchen. Gerade die Beurteilung der funktionell-neurologischen Regeneration ist nur am lebenden Objekt möglich. Eine Vielzahl von relativ einfacher und kostengünstiger funktionell-neurologischer Testverfahren ist für Nagetiere etabliert worden.

4.1. Modellkritik

In der Literatur finden sich Modelle mit einer Ischämiedauer zwischen 3 und 12 Minuten und Nachbeobachtungszeiten zwischen 24 Stunden und 14 Tagen [23, 25, 28, 34, 36, 37]. Das für diese Studie verwendete Modell ist ein standardisiertes, reproduzierbares und valides Modell für den Herz-Kreislaufstillstand und die Reanimation [22]. Es wurden C57BL/6J Mäuse verwendet, da vorherige Versuche ebenfalls mit diesen Tieren durchgeführt wurden.

Die Verwendung von Kaliumchlorid zur Induktion des Herz-Kreislaufstillstandes ist eine etablierte Methode [38]. Es besitzt im Gegensatz zum elektrisch induzierten Kammerflimmern kardioplegische Eigenschaften und schützt so das Myokard. Eine langandauernde Elektrolytentgleisung mit Hyperkaliämie ist nicht zu erwarten, da schon 20 Minuten nach Injektion von Kaliumchlorid keine wesentliche Erhöhung der Kaliumkonzentration im Serum nachzuweisen ist [22].

Die aktuellen Leitlinien zur kardiopulmonalen Reanimation legen ein besonderes Augenmerk auf die Thoraxkompression [39]. Durch Verwendung einer modifizierten Nähmaschine wurden Frequenz und Eindringtiefe standardisiert. Dadurch hat das, in dieser Studie verwendete Modell zur kardiopulmonalen Reanimation, einen Vorteil gegenüber Modellen, die die mechanische Reanimation mit Kompression von 2 Fingern des Untersuchers durchführen.

In der Literatur sind unterschiedliche inspiratorische Sauerstoffkonzentration, vor Induktion der Herz-Kreislaufstillstandes, von Raumluft [34] bis zu einer FiO_2 von 1,0 [23] verwendet worden. In dieser Studie wurden die Tiere nach dem Herz-Kreislaufstillstand zunächst mit 100 % Sauerstoff beatmet und die inspiratorische Sauerstoffkonzentration wurde im Verlauf reduziert. Die Beatmung mit einer inspiratorischen Sauerstoffkonzentration von 0,4 vor dem Kreislaufstillstand, die in diesen Versuchen verwendet wurde, entspricht nicht der realen klinischen Situation, in der der Patient vor dem Herz-Kreislaufstillstand Raumluft geatmet hat. Allerdings sollten Oxygenierungsstörungen durch Atelektasenbildung in Rückenlage der Mäuse vor Induktion des Herz-Kreislaufstillstandes und eine daraus resultierende hämodynamische Instabilität vermieden werden. Es wurden keine arteriellen Blutgasanalysen während des Versuches gemacht, da es sich in Vorarbeiten gezeigt hatte, dass eine arterielle Kanülierung der A. carotis ein unabhängiger Faktor für eine erhöhte Sterblichkeit zur Induktion eines neurologischen Schadens ist. Des Weiteren konnte in Vorarbeiten nachgewiesen werden, dass in dem vorliegenden Versuchsaufbau eine ausreichende Oxygenierung und Decarboxylierung der Tiere erreicht werden konnte.

Die Messung des Blutdrucks erfolgte nicht invasiv, um eine Induktion eines zusätzlichen neurologischen Schadens durch Kanülierung der A. carotis zu verhindern. Eine Kanülierung der A. femoralis ist ebenfalls ungünstig, da es durch die notwendige Ligatur der Arterie nach Entfernung des Katheters, zu einer Ischämie der jeweiligen Extremität kommt, was zu einer Beeinflussung der neurophysiologischen Testverfahren geführt hätte.

Die Temperatur der Versuchstiere wurde konstant bei 36°C gehalten, da sowohl eine Hypothermie als auch eine Hyperthermie ein unabhängiger Prediktor für das Überleben und die funktionell-neurologische Regeneration ist [40,41].

Die pathophysiologischen Abläufe nach globaler Ischämie und Reperfusion sind in ihrem Auftreten und Zeitablauf einzigartig und wurden erstmals durch Negovsky in den 70er Jahren beschrieben und als Postreanimationserkrankung bezeichnet [42]. Diese Erkrankung ähnelt in ihrer Pathophysiologie der Sepsis oder dem „Sepsis like Syndrom“ [43]. Aufgrund dieses dynamischen Prozesses der Erkrankung und der Tatsache, dass die Umbauvorgänge im Gehirn erst nach mehr als sieben Tagen abgeschlossen sind, wurde dieser Versuch als Langzeitversuch angelegt mit dem

Fokus nicht nur auf dem Überleben der Tiere, sondern auch auf die funktionell-neurologische Regeneration nach globaler Ischämie und Reperfusion.

Verschiedene therapeutische Strategien wurden in der Vergangenheit untersucht, um den Ischämie-Reperfusionsschaden zu reduzieren. Nozari et al. zeigten, dass die Gabe von Nitrit die Mortalität in einem Mausmodell senkte und zu einer Verbesserung der neurologischen und myokardialen Funktion führte [41]. Larmann et al. applizierten ICAM-1-Antikörper, welches zu einer verminderten Leukozyteninfiltration ins Hirngewebe führte und zu einer verbesserten neurologischen Erholung der Mäuse [44].

Das Fibrin-Spaltprodukt $B\beta_{15-42}$ inhibiert die Leukozyten-Endothel-Interaktion. Es kommt physiologischerweise im Menschen vor und besteht aus den letzten 28 Aminosäuren des N-terminalen Endes der β -Kette des Fibrin. Es entsteht nach Abspaltung des Fibrinpeptids B von der β -Kette, katalysiert durch Thrombin. Das Fibrin-Spaltprodukt $B\beta_{15-42}$ konkurriert mit dem E1-Fragment des Fibrins um die Bindungsstelle am VE-Cadherin und reduziert somit durch Blockade einer der möglichen Wege der Leukozytenmigration ins Gewebe [13]. Sowohl in einem Nagetiermodell, als auch in einem Schweinemodell war es in der Lage, die Infarktgröße nach myokardialer Ischämie und Reperfusion zu verkleinern [15,16]. Das Fibrin-Spaltprodukt $B\beta_{15-42}$ hat nur eine sehr kurze Halbwertszeit (17 min), so dass sich für eine zweimalige Gabe (zur Reanimation und nach 51 Minuten) entschieden wurde.

Um Einblicke in die Wirkungsweise des Fibrin-Spaltproduktes $B\beta_{15-42}$ zu gewinnen, wurden im Rahmen dieser Untersuchungen Nacharbeiten durchgeführt und histologische Untersuchungen an einer kleinen Anzahl von Versuchstieren nach Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation gemacht. Es wurde die Leukozyteninfiltration mittels CAE-Färbung untersucht sowie intaktes Endothel durch FICT-Lectin-Anfärbung ausgemessen.

4.2. Überleben

Die Versuchstiere der Therapiegruppe (CA/CPR – B β ₁₅₋₄₂) zeigten eine höhere Überlebensrate im Vergleich zu den Versuchstieren der Kontrollgruppe (CA/CPR - NaCl 0,9 %). Dieser Effekt war in den ersten 14 Tagen nach Reanimation nachweisbar.

Um den Tag 9 verzeichneten wir bei einzelnen Versuchstieren in beiden Untersuchungsgruppen eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes, welches dann auch im Tod des jeweiligen Versuchstieres endete. Bei der jeweils durchgeführten Autopsie zeigte sich eine deutlich vergrößerte und prall gefüllte Harnblase, so dass davon auszugehen ist, dass die Tiere an einem postrenalen Nierenversagen aufgrund einer Harnblasenobstruktion verstorben sind. Dies ist ein bisher in der Literatur nicht beschriebenes Phänomen. Die Gabe des Fibrin-Spaltprodukt B β ₁₅₋₄₂ hatte auf dessen Entstehung keinen Einfluss. Die Pathophysiologie ist noch gänzlich unerforscht und ist als ausgeprägter Störfaktor dieser Untersuchung zu betrachten. In weiteren Studien innerhalb der Arbeitsgruppe IRIS konnte gezeigt werden, dass dieses Phänomen bei weiblichen C57/BL/6J - Mäusen nicht auftritt (Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe, bisher nicht publiziert).

Dies zeigt jedoch, wie wichtig es ist, bei einer so komplexen Erkrankung wie der Postreanimationserkrankung Langzeitversuche durchzuführen. Am 28. Tag nach Reanimation ließ sich der Überlebensvorteil der Therapiegruppe gegenüber der Kontrollgruppe nicht mehr nachweisen. Die sehr kurze Halbwertszeit des Fibrin-Spaltprodukt B β ₁₅₋₄₂ von 17 Minuten [15] und der bisher aufgeklärte Wirkmechanismus der verminderten Leukozyteninfiltration ins Gewebe erklären keine Langzeitwirkung. Es überrascht also nicht, dass der positive Effekt des Fibrin-Spaltprodukts B β ₁₅₋₄₂ auf das Überleben am Ende der Nachbeobachtungszeit nicht mehr nachzuweisen ist, da hier lediglich einer der vielen Migrationswege der Leukozyten gehemmt worden ist. Es ist im Gegenteil eher überraschend, dass trotz dieser kurzen Halbwertszeit und der nur zweimaligen Gabe des Peptids, das Fibrin-Spaltprodukt B β ₁₅₋₄₂ das Überleben der Versuchstiere nicht nur in den ersten Stunden und Tagen nach der globalen Ischämie verbessert, sondern dieser Effekt auch zwei Wochen nach Reanimation nachzuweisen ist.

4.3. Körpergewicht

Das Körpergewicht ist ein verlässlicher Indikator für den Allgemeinzustand der Mäuse. In den ersten 3 Tagen konnte ein Verlust des Körpergewichtes von ca. 15 % beobachtet werden. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die verursachte globale Ischämie und Reanimation einen deutlichen Effekt auf das Wohlbefinden der Mäuse hatte. Einen positiven Einfluss auf die Erholung des Körpergewichtes hatte die Therapie mit dem Fibrin-Spaltprodukt B β ₁₅₋₄₂ jedoch nicht.

4.4. Neurophysiologische Testverfahren

Im NeuroScore zeigten alle Tiere am ersten Tag nach Reanimation nur einen Punktwert von 11, als Ausdruck der Schwere der Postreanimationserkrankung und damit Beeinträchtigung der grundlegenden neurologischen Funktionen der Versuchstiere. Allerdings gab es hier keinen Unterschied zwischen den Versuchsgruppen.

Im Elevated Plus Maze-Test gab es hinsichtlich der gelaufenen Strecken, Zeiten in den offenen Armen und Aktivitäten auf den Armen (Aufrichten, Kopf über den Rand strecken) keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

Der RotaRod-Test dagegen untersucht die globale, motorische Funktion, wie Kraft, Ausdauer und vor allem die Koordination der Versuchstiere. Hier waren die Tiere in der Therapiegruppe in der Lage, nach Reanimation tendentiell länger auf der rotierenden Walze zu laufen. Dies kann als ein Ausdruck der schnelleren Erholung der neurologischen Funktionen in der Behandlungsgruppe gewertet werden.

Ein NeuroScore von 12 Punkten, die Teilnahme am RotaRod-Test für mindestens 1 x 5 min und ein Stopp des Gewichtsverlustes waren die Voraussetzungen zur Teilnahme am Water-Maze-Test nach Reanimation. Der Water-Maze-Test erfordert eine unbeeinträchtigte neurologische Funktion der Tiere sowie ausreichend Kraft. Alle überlebenden und teilnehmenden Tiere waren nach Reanimation in der Lage, die Plattform genauso schnell zu finden, wie vor der Reanimation. Direkt vor einer globalen Ischämie Erlerntes wurde in dieser Untersuchung also erinnert. Die Tiere in der Behandlungsgruppe waren zwei Tage früher in der Lage wieder an diesem Test teilzunehmen, als Ausdruck der schnelleren Erholung der grundlegenden

neurologischen Funktionen. Außerdem erfüllten eine höhere Anzahl von Tieren in der Behandlungsgruppe überhaupt wieder die Kriterien zur Teilnahme an diesem Test. Auch dies ist ein Indikator für die bessere globale Erholung der neurologischen Funktion der Tiere in der Therapiegruppe.

4.5. Histologie/Immunhistochemie

Sowohl nach 1,5 h, als auch 8 h nach Reanimation war bei den Tieren der Behandlungsgruppe eine geringe Leukozyteninfiltration ins Lungengewebe, als auch längeres intaktes Endothel nachzuweisen. Dies bestätigt erneut den bereits vorher nachgewiesenen Effekt des Fibrin-Spaltproduktes B β ₁₅₋₄₂.

Die Postreanimationserkrankung wird auch als „Sepsis-like-Syndrome“ bezeichnet [43], da die pathophysiologischen Vorgänge der einer Sepsis ähneln. Dabei sind Schädigung des Endothels, eine erhöhte Leukozyteneinwanderung ins Gewebe und eine Gerinnungsaktivierung zu beobachten.

Fink et al. identifizierten einen schweren Endothelschaden nach kardiopulmonaler Reanimation an Patienten, indem sie zirkulierende Endothelzellen und Endothelfragmente im Serum von reanimierten Patienten nachwiesen [7,45]. Huet et al. wiesen einen Endothelzell-schädigenden Effekt des Plasmas von reanimierten Patienten nach. Sie inkubierten humane Endothelzellen (HUVEC) mit Plasma von reanimierten Patienten, woraufhin ein Endothelzelluntergang von 66 % zu beobachten war. Interessanterweise war das Plasma von septischen Patienten deutlich geringer endothelzellschädigend (34 %) [46].

Der blockierende Einfluss des Fibrin-Spaltproduktes B β ₁₅₋₄₂ auf einen der möglichen Wege der Leukozytenadhäsion und -migration und der stabilisierende Effekt auf die pulmonal-vaskuläre Integrität könnte eine Ursache des verbesserten Überlebens der Versuchstiere in der Therapiegruppe sein.

Das vaskuläre Endothel kleidet das gesamte Gefäßsystem aus. Seine Integrität ist notwendig, um Stoffwechselprozesse wie Signaltransduktion, parakrine Sekretion, Produktion von Zytokinen, Regulation von Leukozytenadhäsion und -transmigration, sowie pro- und antikoagulatorische Effekte zu gewährleisten [47]. In den letzten Jahren mehren sich die Daten, dass Störungen der endothelialen Integrität

ursächlich für Störungen der kognitiven Funktionen sein können. Dies wurde insbesondere an Patienten, die an einem Schlaf-Apnoe-Syndrom leiden und dadurch rezidivierend Ischämie/Reperfusion-induzierte endotheliale Schädigungen ausgesetzt waren, nachgewiesen [48]. Als mögliche Pathomechanismen wird eine Lipidperoxidation [49], eine erhöhte Produktion von löslichen Adhäsionsmolekülen und der Generation reaktiver Sauerstoffspezies [50], eine Imbalanz zwischen Vasokonstriktoren wie Endothelin-1 oder Thromboxan und Vasodilatoren wie NO oder Prostazyklin diskutiert [51]. Eine Stabilisierung der Endothelfunktion könnte daher eine therapeutische Option sein.

4.6. Kritik der neurophysiologischen Testverfahren

Ein wichtiges Instrument zur Beurteilung des Allgemeinbefindens der Versuchstiere ist das Körpergewicht. Tiere, die in ihrem Allgemeinzustand beeinträchtigt sind, fressen nicht und verlieren aufgrund des hohen spezifischen Stoffwechsels sehr schnell an Körpergewicht. Eine Erholung des Tieres drückt sich dann wiederum in einer Gewichtszunahme aus. Somit ist das Körpergewicht bzw. dessen Verlauf ein sehr guter Parameter zur Beurteilung des Allgemeinbefindens [52].

Zur Beurteilung der funktionell-neurologischen Regeneration sollte in dieser Untersuchung sowohl die Erholung grundlegender Funktionen, wie Aktivität, Neugier, Koordinationsvermögen und Kraft untersucht werden, als auch die Fragestellung, ob die Tiere in der Lage waren, sich nach einem Herz-Kreislaufstillstand und erfolgreicher Reanimation an etwas kurz zuvor Erlerntes zu erinnern.

Zur Erhebung der grundlegenden Funktionen wie Bewegung, Atmung und Reflexe diente der NeuroScore. Allerdings ist er ähnlich wie die Erhebung der GCS ein relativ subjektiver Parameter und kann bei nicht ausreichender Schulung eine deutliche Untersucher-Bias aufweisen. Außerdem scheint der Test, anders als die GCS, den Schweregrad der Erkrankung nur schlecht abzubilden. Dies erklärt die hohe Sterblichkeit in den ersten Tagen nach Reanimation in der Kontrollgruppe trotz fast normwertiger bzw. hoher Punktzahl im NeuroScore.

Der Elevated Plus Maze-Test ist ebenfalls ein geeignetes Mittel zur Beurteilung der Bewegung und Neugier der Tiere. Auch hier kann es zu untersucherbedingten Unterschieden in der Auswertung kommen, so dass auch diese Auswertung in Bezug

auf die Gruppenzugehörigkeit verblindet wurde. Allerdings zeigte sich bei der Auswertung der Videoaufnahmen, dass dieser Test sehr anfällig ist für Störungen aus der Umgebung, wie Gespräche im Untersuchungsraum, Klappen von Türen etc., welche die Mäuse sehr verunsichert haben. Außerdem zeigten die Tiere eine gewisse Gewöhnung an den Test und ein nachlassendes Interesse, die Arme des Elevated Plus Maze zu erkunden, so dass ein größerer Abstand zwischen den einzelnen Untersuchungen von Vorteil gewesen wäre. Des Weiteren bildet sich in diesem Test nicht ab, dass einige Mäuse zwar sehr aktiv waren und sich zum Beispiel minutenlang geputzt haben, allerdings kaum gelaufen sind. Man muss aufgrund der beschriebenen Störungen bei der Testdurchführung die Verwertbarkeit dieses Tests im Zusammenhang mit dieser Untersuchung kritisch betrachten.

Der RotaRod-Test ist vor allem zur Prüfung der motorischen Kraft, Koordinationsfähigkeit und der Ausdauer der Mäuse geeignet. Da hier nur die Zeit gemessen wird, die die Mäuse in der Lage waren auf der Walze zu laufen, gibt es keine untersucherbedingten Unterschiede [53]. Außerdem waren die Mäuse durch das Drehen der Walze gezwungen an diesem Test mit voller Konzentration teilzunehmen.

Das gleiche gilt für den Water-Maze-Test. Auch hier wurde nur die Zeit bis zum Auffinden der Plattform aufgezeichnet und war damit untersucherunabhängig. Außerdem ist dieser Test vor allem geeignet, um zu überprüfen, ob die Tiere in der Lage waren sich an etwas vor dem Herz-Kreislaufstillstand Erlerntes zu erinnern, wie hier das Auffinden der Plattform. Außerdem kann mit diesem Test untersucht werden, ob sie dann in der Lage sind Neues zu erlernen. Im Vergleich zur Originalpublikation [29] wurde in dieser Untersuchung ein kleineres Becken zum Schwimmen verwendet. Außerdem wurde nur ein Parameter (Zeit bis zur Plattform) gemessen und nicht wie in der Originalarbeit mehrere Parameter wie Schwimmgeschwindigkeit, Zeit in einzelnen Quadranten etc. aufgezeichnet. Dies war begründet in der zu dem Zeitpunkt dieser Studie bestehenden Limitation im vorhandenen Equipment. Trotzdem konnte die wichtigste Aussage ermittelt werden.

5. Schlussfolgerung

Das Fibrin-Spaltprodukt B β ₁₅₋₄₂ hat einen positiven Effekt auf das Überleben von Mäusen innerhalb der ersten 14 Tage nach Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation.

Die Ergebnisse der histologischen und immunhistochemischen Aufarbeitungen legen nahe, dass dieser Effekt über einen Schutz der vaskulären Integrität und Verminderung der Leukozytentransmigration in das Gewebe (in dieser Untersuchung pulmonal) vermittelt wird.

Außerdem hat es einen positiven Effekt auf die Erholung neurologischer Funktionen nach globaler Ischämie und Reperfusion.

Damit ist das Fibrin-Spaltprodukt B β ₁₅₋₄₂ ein vielversprechender therapeutischer Ansatz in der Behandlung der Postreanimationserkrankung.

Aufgrund der Komplexität der Postreanimationserkrankung ist nicht zu erwarten, dass es nur ein „Heilmittel“ geben kann und wird, um sowohl das Überleben, als auch die funktionell-neurologische Regeneration nach Herz-Kreislaufstillstand zu verbessern. Viel mehr wird es ein multimodales therapeutisches Konzept sein, in der jede einzelne therapeutische Strategie in den verschiedenen Phasen der Postreanimationserkrankung angreift.

6. Selbständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit eidesstattlich, dass mir bei dem Erstellen dieser Promotionsarbeit keine weitere Hilfe zuteil geworden ist und ich bei der Anfertigung der Dissertation keine anderen als die in der Arbeit genannten Hilfsmittel benutzt habe.

Rostock, 18.01.2013

Claudia Beltschany

7. Thesen

1. Zur Verbesserung der schlechten Überlebensraten und der funktionell-neurologischen Regeneration nach Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation ist eine weiterführende klinische und experimentelle Forschung notwendig.
2. Zur Beurteilung der funktionell-neurologischen Regeneration sind Langzeitstudien unabdingbar.
3. Zur Aufklärung der pathophysiologischen Mechanismen und Entwicklung von therapeutischen Strategien ist das Tiermodell als Instrument der Grundlagenforschung unverzichtbar.
4. Nach globaler Ischämie und Reperfusion, kommt es zur Aktivierung des Gerinnungs- und Immunsystems. Die nachfolgenden inflammatorischen Prozesse gehen mit einer Störung der vaskulären Integrität und einer Einwanderung von Leukozyten ins Gewebe einher.
5. Das Fibrin-Spaltprodukt $B\beta_{15-42}$ hat keine nachweisbaren negativen Eigenschaften nach Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation im Tierversuch.
6. Das Fibrin-Spaltprodukt $B\beta_{15-42}$ reduziert die Leukozyteninfiltration in der frühen Phase der globalen Ischämie und Reperfusion.
7. Durch die Applikation des Fibrin-Spaltproduktes $B\beta_{15-42}$ lässt sich in den ersten Tagen nach Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation eine Verbesserung des Überlebens erreichen.
8. Die Verbesserung des Überlebens scheint u.a. durch eine Protektion der pulmonal-vaskulären Integrität vermittelt zu werden.
9. Die Verbesserung der Überlebensrate in den ersten Tagen nach Reanimation geht mit einer tendenziellen Verbesserung der funktionell-neurologischen Regeneration der Versuchstiere einher.
10. Männliche C57BL/6J-Mäuse scheinen für Langzeitversuche zur Beurteilung des Überlebens und der funktionell-neurologischen Regeneration ungeeignet zu sein.

8. tabellarischer Lebenslauf

Name: Claudia Beltschany

Geburtsdatum: 13.05.1977

Geburtsort: Pößneck

Wissenschaftliche Vorträge

September 2010: Chirurgische Forschungstage Rostock: „Das Fibrin-Spaltprodukt B β ₁₅₋₄₂ verbessert das Überleben und die funktionell-neurologische Regeneration nach kardiopulmonaler Reanimation – Untersuchungen an einem murinen Reanimationsmodell“

November 2010: NAT (Norddeutsche Anästhesietage) Bremen: „Das Fibrin-Spaltprodukt B β ₁₅₋₄₂ verbessert das Überleben und die funktionell-neurologische Regeneration nach kardiopulmonaler Reanimation – Untersuchungen an einem murinen Reanimationsmodell“

Beruflicher Werdegang

Januar 2011: Facharztprüfung im Fach Anästhesiologie

Mai 2008: Zusatzbezeichnung Notfallmedizin

Seit Oktober 2004: Ärztin in der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie der Universität Rostock

Juli 2003 - September 2004: Ärztin im Praktikum in der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie der Universität Rostock

Studium

Oktober 1996 - Juni 2003: Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock

Schulische Ausbildung

Juli 1996: Abitur

August 1995 - Juli 1996: Gymnasium am Goetheplatz in Rostock

Juni 1995:	Graduation Westside High School in Omaha/Nebraska, USA
August 1994 - Juni 1995:	Westside High School in Omaha/Nebraska, USA
August 1991 - Juni 1994:	Gymnasium am Goetheplatz in Rostock
September 1988 - Juni 1991:	71. Polytechnische Oberschule in Rostock
September 1985 - Juni 1988:	Polytechnische Schule in Triptis

Rostock, 18.01.2013

Claudia Beltschany

9. Literatur

1. Nolan JP, Soar J et al. European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2010. *Resuscitation* 2010; 81:1219-1276
2. Püttgen HA, Pantle H, Geocadin RG. Management of cardiac arrest patients to maximize neurologic outcome *Curr Opin Crit Care* 2009; 15:118-124
3. Neumar RW, Nolan JP et al. Post Cardiac Arrest Syndrome: Epidemiology, Pathophysiology, Treatment, and Prognostication A Consensus Statement From the International Committee on Resuscitation. *Circulation* 2008; 118: 2452-2483
4. Schneider A, Popp E, Böttiger BW. Postreanimationstherapie-
Therapiekonzepte und Prognosestellung *Anästhesiol/Intensivmed/Notfallmed Schmerzther* 2007; 6:408-414
5. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion- from mechanism to translation. *Nat Med* 2011; 17(11):1391-1401
6. Böttiger BW et al. Marked activation of complement and leucocytes and an increase in the concentrations of soluble endothelial adhesion molecules during cardiopulmonary resuscitation and early reperfusion after cardiac arrest in humans. *Crit Care Med* 2002; 30:2473-2480
7. Fink K, Schwarz M, Feldbrügge L et al. Severe endothelial injury and subsequent repair in patients after successful cardiopulmonary resuscitation. *Crit Care* 2010; 14:R104
8. Perpedy MA, Callaway CW, Neumar RW, Geocadin RG, Zimmermann JL et al. Part 9: post-cardiac arrest care: 2010 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation* 2010; 122:S768-786
9. Colvin RB, Johnson RA, Mihm MC Jr, Dvorak HF. Role of the clotting system in cell-mediated hypersensitivity. I. Fibrin deposition in delayed skin reactions in man. *J Exp Med* 1973; 138:686-698
10. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury *N Engl J Med*. 2007; 357:1121-1135
11. Busso N, Péclat V, Van Ness K, Kolodzieczyk E, Degen J, Bugge T, So A. Exacerbation of antigen-induced arthritis in urokinase-deficient mice. *J Clin Invest* 1998; 102:41-50

12. Shaw SK, Bamba PS, Perkins BN, Luscinskas FW. Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium. *J Immunol* 2001; 167:2323-2330
13. Petzelbauer P, Zacharowski PA, Miyazaki Y, Friedl P, Wickenhauser G, Castellino FJ, Gröger M, Wolff K, Zacharowski K. The fibrin-derived peptide Bbeta15-42 protects the myocardium against ischemia-reperfusion injury. *Nat Med* 2005; 11:298-304
14. Kudryk B, Robinson D, Netré C, Hessel B, Blombäck M, Blombäck B. Measurement in human blood of fibrinogen/fibrin fragments containing the Bβ15–42 sequence. *Thromb Res* 1982; 25:277-291
15. Roesner JP, Petzelbauer P et al. The fibrin-derived peptide Bβ₁₅₋₄₂ is cardioprotective in a pig model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Crit Care Med* 2007; 35:1730-1735
16. Zacharowski K, Zacharowski PA, Friedl P, Mastan P, Koch A, Boehm O, Rother RP et al. The effects of the fibrin-derived peptide Bbeta (15-42) in acute and chronic rodent model of myocardial ischemia-reperfusion. *Shock* 2007; 27:631-637
17. Roesner JP, Petzelbauer P, Koch A, Tran N, Iber T, Vagts DA, Scheeren TW, Vollmar B, Nöldge-Schomburg GE, Zacharowski K. Bbeta (15-42) (FX06) reduces pulmonary, myocardial, liver, and small intestine damage in a pig model of hemorrhagic shock and reperfusion. *Crit Care Med* 2009; 37:598-605
18. Roesner JP, Petzelbauer P, Koch A, Tran N, Iber T, Mutz C, Vollmar B, Nöldge-Schomburg GE, Zacharowski K. A double blind, single centre, sub-chronic reperfusion trial evaluating FX06 following hemorrhagic shock in pigs. *Resuscitation* 2009; 80:264-271
19. Matt u, Warszawska JM, Bauer M, Dietl W, Mesteri J. Bbeta (15-42) protects against acid-induced lung injury and secondary pseudomonas pneumonia in vivo. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180:1208-1217
20. Atar et al. Effect of intravenous FX06 as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention for acute ST-segment elevation myocardial infarction results of the F.I.R.E. trial. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53:720-729
21. Hallén J, Petzelbauer P, Schwitter J, Geudelin B, Buser P, Atar D. Impact of time to therapy and presence of collaterals on the efficacy of FX06 in acute ST

- elevation myocardial infarction: a substudy of the F.I.R.E., the efficacy of FX06 in the protection of myocardial reperfusion injury trial. *Eurointervention* 2010; 5:546-552
22. Menzebach A, Bergt S, von Waldthausen P, Dinu C, Nöldge-Schomburg GE, Vollmar B. A comprehensive study of survival, tissue damage and neurological dysfunction in a murine model of cardiopulmonary resuscitation after potassium-induced cardiac arrest. *Shock* 2010; 33:189-196
 23. Abella BS, Zhao D, Alvarado J, Hamann K, Vanden Hoek TL, Becker LB. Intra-arrest cooling improves outcomes in a murine cardiac arrest model. *Circulation* 2004; 109:2786-2791
 24. Hutchens et al: Soluble epoxide hydrolase gene deletion reduces survival after cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation. *Resuscitation* 2008; 76:89-94
 25. Neigh et al: Cardiac arrest/cardiopulmonary resuscitation increases anxiety behavior and decreases social interaction. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; 24:372-382
 26. Pellow et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in rat. *J Neuroscience Method* 1985; 14:149-167
 27. Lister RG. The use of plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 1987; 92:180-185
 28. Böttiger BW, Teschendorf P, Krumnikl JJ et al. Global cerebral ischemia due to cardiocirculatory arrest in mice causes neuronal degeneration and early induction of transcription factor genes in the hippocampus. *Molecular Brain Research* 1999; 65:135-142
 29. Neigh GN, Glasper ER, Kofler J et al. Cardiac arrest with cardiopulmonary resuscitation reduces dendritic spine density in CA1 pyramidal cells and selectively alters acquisition of spatial memory. *Eur J Neurosci* 2004; 20:1865-1872
 30. Larson J et al. Endothelial EphA receptor stimulation increases lung vascular permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 255:L431-435
 31. Schneider A, Böttiger BW, Popp E. Cerebral Resuscitation After Cardiocirculatory Arrest. *Anaesthesia/Analgesia* 2009; 108:971-979
 32. Stephenson HE Jr, Reid LC, Hinton JW. Some common denominators in 1200 cases of cardiac arrest. *Ann Surg* 1953; 137:731-744

33. Papadimitriou D, Xanthos T, Dontas I, Lelovas P, Perrea D. The use of mice and rats as animal models for cardiopulmonary resuscitation research *Laboratory Animals* 2008; 42:265-276
34. Song et al. Cardiopulmonary resuscitation in the mouse. *Journal of Applied Physiology* 2002; 93:1222-1226
35. Theochari E, Xanthos D, Papadimitriou D et al. Selective beta blockade improves the outcome of cardiopulmonary resuscitation in a swine model of cardiac arrest. *Ann Ital Chir* 2008; 79:409-414
36. Dezfulian C, Shiva S, Alekseyenko A et al. Nitrite therapy after cardiac arrest reduces reactive oxygen species generation, improves cardiac and neurological function and enhances survival via reversible inhibition of mitochondrial complex. *Circulation* 2009; 120:897-905
37. Hutchens MP, Traystman RJ, Fujiyoshi T et al. Normothermic cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation: a mouse model of ischemia-reperfusion injury. *J Vis Exp* 54pii:3116 doi:10.3791/3116
38. Zhao D, Abella BS, Beiser DG et al. Intra-arrest cooling with delayed reperfusion yields higher survival than earlier normothermic resuscitation in a mouse model of cardiac arrest. *Resuscitation* 2008; 77:242-249
39. Koster RW, Bautin MA et al. European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2010 Section 2. Adult basic life support and use of automated external defibrillators. *Resuscitation* 2010; 8:1277-1292
40. Nolan JP, Morley PT, Vanden Hoek TL et al. International Liaison Committee on Resuscitation. Therapeutic hypothermia after cardiac arrest: an advisory statement by the advanced life support task force of the International Liaison Committee on Resuscitation. *Circulation* 2003; 108:118-121
41. Nozari A, Safar P, Stezoski SW et al. Critical Time Window for Intra-Arrest Cooling With Cold Saline Flush in a Dog Model of Cardiopulmonary Resuscitation *Circulation* 2006; 113:2690-2696
42. Negovsky VA. The second step in resuscitation: the treatment of the "post-resuscitation disease" *Resuscitation* 1972; 1:1-7
43. Adrie C, Laurent I, Monchi M, Cariou A, et al. Postresuscitation disease after cardiac arrest: a sepsis-like syndrome? *Curr Opin Crit Care* 2004; 10:208-212

44. Larmann J, Schmidt C, Gammel H, Van Aken HK et al. Inter cellular adhesion molecule-1 inhibition attenuates neurologic and hepatic damage after resuscitation in mice. *Anesthesiology* 2005; 103:1149-1155
45. Fink K, Feldbrügge L, Schwarz M, Bourgeois N et al. Circulating annexin V positive micropartikel in patients after successful cardiopulmonary resuscitation. *Crit Care* 2011; 15:R251
46. Huet O, Dupie L, Batteux F, Matar C et al. Postresuscitation Syndrome: Potential role of hydroxyl radical-induced endothelial cell damage. *Crit Care Med* 2011; 39:1712-1720
47. Karimova A, Pinsky DJ. The endothelial response to oxygen deprivation: biology and clinical implications. *Intensive Care Med* 2001; 27:19-31
48. Lavie L . Obstructive sleep apnoea syndrome—an oxidative stress disorder. *Sleep Med Rev* 2003; 7:35–51
49. Lavie L , Vishnevsky A , Lavie P . Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea . *Sleep* 2004; 27:123–128
50. Dyugovskaya L , Lavie P , Lavie L . Increased adhesion molecules expression and production of reactive oxygen species in leukocytes of sleep apnea patients . *Am J Respir Crit Care Med* 200; 165:934–939
51. Ip MS , Lam B , Chan LY et al . Circulating nitric oxide is suppressed in obstructive sleep apnea and is reversed by nasal continuous positive airway pressure. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:2166–2171
52. Ullmann-Culleré MH, Foltz CJ. Body condition scoring: a rapid and accurate method for assessing health status in mice. *Lab Anim Sci* 1999; 49:319-323
53. Kumaran et al: Benzamide protects delayed neuronal death and behavioural impairment in a mouse model of global cerebral ischemia. *Behav Brain Res* 2008; 192:178-184